

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平8-511417

(43) 公表日 平成 8 年(1996)12月 3 日

(51) Int.Cl.⁸

C 1 2 N 15/09

識別記号

庁内整理番号

9162-4B

F I

C 1 2 N 15/00

A

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 71 頁)

(21) 出願番号 特願平6-523068
 (86) (22) 出願日 平成 5 年(1993) 4 月 9 日
 (85) 翻訳文提出日 平成 7 年(1995)10月 9 日
 (86) 国際出願番号 PCT/US 93/03408
 (87) 国際公開番号 WO 94/24278
 (87) 国際公開日 平成 6 年(1994)10月27日
 (81) 指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M C, NL, PT, SE), CA, JP

(71) 出願人 カタリティック アンティボディーズ, インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94304, パロ アルト, スイート 100, ハンセン ウェイ 3030
 (71) 出願人 デイビス, クロード ジェフリー
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94131, サンフランシスコ, メルカト コート 10
 (71) 出願人 ファビアン, ゲイリー ロバート
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94061, レッドウッド シティ, ルビー ストリート 1163
 (74) 代理人 弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 触媒抗体をコードする遺伝子の選択

(57) 【要約】

本発明は、標的ペプチドを切断するのに有効な触媒抗体をスクリーニングまたは選択する方法について記載する。特に、本発明の選択方法では、ファージの産生に必要な遺伝子産物をコードするファージ遺伝子が選択される。改変された遺伝子を有するファージが宿主に導入される。また、クローニングベクター内の再配置された免疫グロブリン遺伝子のライブラリーが宿主細胞に導入される。宿主細胞は、免疫グロブリン遺伝子が宿主細胞内で発現する条件下で成長する。標的ペプチドを切断し得る抗体の存在がファージの産生に基づいて同定される。

【特許請求の範囲】

1. 選択された標的ペプチドを切断し得る触媒抗体をコードする遺伝子を選択する方法であって、

(i) 適切な発現条件下で、クローニングベクターにおいて免疫グロブリン遺伝子を発現し得る該クローニングベクター内の再配置された免疫グロブリン遺伝子のライブラリー、および (ii) 感染性ファージの産生に必要な遺伝子産物をコードするファージ遺伝子を有するファージベクター、を宿主細胞に導入する工程であって、該遺伝子は、該標的ペプチドのコーディング配列を、該遺伝子中に、得られる遺伝子産物が感染性ファージの産生を阻害するように導入することによって改変され、そして該標的ペプチドの切断により、感染性ファージの産生を可能とする活性遺伝子産物が得られる、工程、

該免疫グロブリン遺伝子が該宿主細胞内で発現する条件下で該宿主細胞を成長させる工程、

感染性ファージの産生のために該宿主細胞をスクリーニングする工程、および該感染性ファージと結合した該免疫グロブリン遺伝子を単離する工程を包含する方法。

2. 前記スクリーニングする工程が、ブラーク形成によって感染性ファージの存在を検出する工程を包含する、請求項 1 に記載の方法。

3. 前記ファージ遺伝子がファージコートタンパク質をコードする、請求項 1 に記載の方法。

4. 前記宿主細胞が *Escherichia coli* 細胞であり、前記ファージ遺伝子がバクテリオファージ M13 の遺伝子 III であり、そして、前記標的配列が、該遺伝子 III 産物の該宿主細胞の周辺腔への輸出を阻害するように該遺伝子 III に導入される、請求項 3 に記載の方法。

5. (i) 前記ファージ遺伝子が、選択された成長条件の下でブラーク形成に必要なファージタンパク質、該ファージタンパク質の一方の端部に結合されると該ファージタンパク質を不活性化する第 2 のタンパク質、および該第 2 のタンパク質を該ファージタンパク質に結合する前記標的よりなる融合タンパク質をコードする、請求項 1 に記載の方法、を包含する方法。

ドし、そして (ii) 前記スクリーニングする工程が、前記選択された成長条件の下で成長させるときブラークを産生し得るファージを検出する工程を包含する、請求項 1 に記載の方法。

6. 前記ファージが λ ファージであり、前記ファージタンパク質が cro タンパク質であり、そして、該ファージが、選択された温度を超えると不活性であるそのゲノム cro 遺伝子内に温度条件突然変異を含み、ならびに、前記スクリーニングする工程が該選択された温度を超えて実行される、請求項 5 に記載の方法。

7. 前記ファージタンパク質が λ cro タンパク質であり、そして、前記第 2 のタンパク質が *Escherichia coli* コリシン E1 免疫タンパク質である、請求項 6 に記載の方法。

8. 標的ペプチド配列を切断するのに有効な触媒抗体を産生する方法であって、

(i) 適切な発現条件下で、クローニングベクターにおいて免疫グロブリン遺伝子を発現し得る該クローニングベクター内の再配置された免疫グロブリン遺伝子のライブラリー、および (ii) 感染性ファージの産生に必要な遺伝子産物をコードするファージ遺伝子を有するファージベクター、を宿主細胞に導入する工程であって、該遺伝子は、該標的ペプチドのコーディング配列を、該遺伝子中に、得られる遺伝子産物が感染性ファージの産生を阻害するように導入することによって改変され、そして該標的ペプチドの切断により、感染性ファージの産生を可能とする活性遺伝子産物が得られる、工程、

該免疫グロブリン遺伝子が該宿主細胞内で発現する条件下で該宿主細胞を成長させる工程、

感染性ファージの産生のために該宿主細胞をスクリーニングする工程、

該感染性ファージと結合した該免疫グロブリン遺伝子を単

離する工程、および

該単離された免疫グロブリン遺伝子を適切な発現系内で発現させる工程

【発明の詳細な説明】

触媒抗体をコードする遺伝子の選択

本出願は、同時係属、共同所有の 1990 年 9 月 5 日に提出された米国特許出願第 07/577,906 号の一部継続出願である。

1. 発明の分野

本発明は、特定のペプチド配列を切断し得る触媒抗体の同定に有効なスクリーニングおよび選択方法に関する。特に、IgE 分子を切断し得る抗体の選択に関する。

2. 参考文献

Arber, W. ら、Lambda II、R. W. Hendrix ら編、Cold Spring Harbor Laboratory、Cold Spring Harbor NY、433-466 頁 (1983)。

Ausubel, F. M. ら、Current Protocols in Molecular Biology、John Wiley and Sons, Inc., Media PA。

Better, M. ら、Science **240**:1041 (1988)。

Ciccarelli, E. ら、Biochem. Biophys. Res. Commun. **181**:865 (1989)。

Crea, R.、米国特許第 4,888,286 号、1989 年 12 月 19 日発行。

Cross, C. E.、Bronchial Asthma: Principles of Diagnosis and Treatment、第 2 版、M. E. Gershwin 編、

Grunc and Stratton (Harcourt Brace Jovanovich)発行、39
-47頁(1986)。

Davis, R.W.ら、A manual for genetic engineering. Advanced Bacterial Genetics、Cold Spring Harbor Laboratory、Cold Spring Harbor NY (1980)。

Dayhoff, M.O.ら、Methods in Enzymology 91:524 (1983)。

Doolittle, R.F.、Science 214:149 (1981)。

Eaton, M.A.W.ら、米国特許第4,719,180号、1988年1月12
日発行。

Gargiulo, R.J.ら、米国特許第4,336,188号、1982年6月2
2日発行。

Goldman, K.ら、FEBS Letters 190(2):319 (1985)。

Gussin, G.M.ら、Lambda II、R.W. Hendrixら編、Cold
Spring Harbor Laboratory、Cold Spring Harbor NY、93-12
1頁(1983)。

Helm, B.ら、Nature 331:180 (1988)。

Helm, B.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. 86:9465 (1989)。

Hubacek, J.ら、J. Mol. Biol. 50:111 (1970)。

Huse, W.D.ら、Science 246:1275 (1989)。

Hussain, K.ら、Mol. Microbiol. 1(1):73 (1987)。

Ishizaka, T.ら、Immunochemistry 7:687 (1970)。

Jones, E.W.、Genetics 85:23 (1977)。

Jones, E.W.ら、Alfred Benzon Symposium、D. von
Wettsteinら編、18:183、Copenhagen、Munksgaard。

Biol. 43:77 (1978)。

Ullmann, A.、Gene 29:27 (1984)。

Weisberg, R.A.ら、Virology 95:99 (1979)。

Woo, S.L.C.、Methods in Enzymology 68:389 (1979)。

Yoshio, T.ら、米国特許第4,849,350号、1989年7月18日発
行。

Yamada, M.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:2827 (19
82)。

3. 発明の背景

ヒトの体内に異物が入ると、個体は、典型的にはこの物質に対する抗体を生成することにより免疫応答を高めることによって反応する。同じ物質が次に侵入するときは、通常は、より迅速でより強い応答を示す。ほとんどの場合、この反応により感染の臨床学的な経路からの保護(免疫)が与えられる。しかし、物質が、抗体が介在するアレルギー応答を引き起こす場合のように、免疫応答はいつでも有益であるとは限らない。世界人口の約5~10%の人々がアレルギー症状を有し、3千万から3千5百万の米国民(人口の15%)が少なくとも1つの顕著なアレルギー症状を有すると推測される。

最も一般的なアレルギーの中心的な分子は、免疫グロブリンEクラス(IgE)の抗体である。全体的に見れば、IgEは全血清の微細な部分を構成しているに過ぎない。IgEの血清免疫グロブリンレベルは1ミリリットル(ml)当たり200ナノ
グラム

μ (ng)の範囲である。これに比べて、IgGは12mg/ml、IgMは1mg/mlである。IgEはこのように低いレベルであるため、生理学的機能について疑問が生じている。IgEは虫のような大きな寄生生物に対する体の防御においては役割を果たしているという証拠があるが、たとえそうであっても、単に取るに足りない効果があるだけである。一般的に、寄生生物の感染には抗寄生生物剤による処置が必要であり、いずれにせよ、寄生生物は一般には第3世界の国々以外では健康問題であるとはみな

Kabat, E.A.ら、Sequences of Proteins of Immuno-
logical Interest、U.S. Public Health Service、National
Institutes of Health、Bethesda、MD (1987)。

Maniatis, T.ら、Molecular Cloning: A Laboratory
Manual、Cold Spring Harbor Laboratories、Cold Spring H
arbor, NY (1982)。

Miller, J.R.、Experiments in molecular genetics、
Cold Spring Harbor Laboratories、Cold Spring Harbor、
NY (1972)。

Mieschendahl, M.ら、J. Bacteriol. 164(3):1366 (1985)。

Morrison, S.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. 81: 6851 (198
4)。

Mullis, K.、米国特許第4,683,202号、1987年7月28日発行。

Needleman, S.B.ら、J. Mol. Biol. 48:443 (1970)。

Oka, A.ら、Mol. Gen. Genet. 172:151 (1982)。

O'Shannessy, D.J.ら、Immun. Letters 8:273 (1984)。

Ovchinnikov, Y.A.ら、Gene 6:235 (1979)。

Radhakrishnan, R.ら、米国特許第4,895,719号、1990年1
月23日発行。

Roberts, T.W.ら、Nature 270:274 (1977)。

Short, J.W.ら、Nucleic Acids Res. 16:7583 (1988)。

Skerra, A.ら、Science 240:1038 (1988)。

Smith, R.E.、米国特許第3,862,011号。

Sutcliffe, J.G.ら、Cold Spring Harbor Symp. Quant.

されない。他にはIgEの有益な役割はない。

アレルギー応答の第1段階は、特定のレセプター(IgE/Fcレセプター)を介してマスト細胞および好塩基性顆粒細胞の表面に固定されるIgE分子にアレルゲンが結合することである。単離したFcフラグメントによりIgE/Fcレセプターを遮断する試みが報告されている(Helmら、1989)。この方法には2つの制約がある。第1に、Fcレセプターに対するFcフラグメントの親和力は完全なIgE分子の親和力の約10分の1であるため、IgEの結合を効果的に遮断するには高濃度を投与する必要がある。第2に、このフラグメントを高濃度で注入すると、フラグメント自体に免疫応答する結果となり得る。Fcに対する抗体が実際に生成されるならば、これらの抗体はFcレセプター上でFcフラグメントと架橋し、これにより、すべてのマスト細胞および好塩基性顆粒細胞を活性化する。この結果、アナフィラキシーショックを引き起こし得る。

現在試験中の第2の方法は、IgE分子のFcレセプター結合ド

メインに結合する抗体を投与することである。このような抗体は循環しているIgEを実質的に吸収し、これがマスト細胞および好塩基性顆粒細胞に結合するのを防ぐ。この方法の欠点は、(1)抗体は既にFcレセプターに既に結合したIgE分子には効果的に結合しないこと、および(2)抗体を高い投与量で投与しなければならぬため合併症の危険が増大することである。

4. 発明の要旨

本発明は、標的ペプチドを切断するのに有効な触媒抗体を選択する方法を記載する。本方法では、標的ペプチドが選択される。また、ファージの産生に必要な遺伝子産物をコードするファージ遺伝子が選択される。この遺伝子は、得られる遺伝子産物が、

(i) 感染性ファージの産生を阻害し、そして

(ii) この標的ペプチドを切断すると、感染性ファージの産生を可能とする活性遺伝子産物が得られるように、標的ペプチドコーディング配列を遺伝子中に導入することによって改変される。

改変遺伝子を有するファージは宿主に導入される。また、クローニングベクタ

ー内で再配置された免疫グロブリン遺伝子ライブラリーが宿主細胞に導入される：このベクターライブラリーは、適切な発現条件下で、クローニングベクターにおいて免疫グロブリン遺伝子を発現し得る。宿主細胞は、免疫グロブリン遺伝子が宿主細胞において発現される条件下で

成長させる。標的ペプチドを切断し得る抗体の存在はファージの産生に基づいて同定される。

5. 図面の簡単な説明

図1AはIgE抗体を示す。

図1Bは1つの代表的なIgG抗体を示す。

図2は、様々なドメイン、ジスルフィド結合、および炭水化物基を含むIgE分子の略図を示し、また、ペプチドIおよびIIの位置およびIgE Fcレセプターに結合する領域を示す。

図3は、IgE H鎖の定常領域のアミノ酸配列を示す。ペプチドIおよびIIならびにFcR結合ドメインには下線を付している。

図4は、組み合わせ抗体遺伝子ライブラリーの構築に用いられるベクターを示す。

図5A、5B、および5Cは、目的とする標的領域を含むマウス抗ラットIgG抗体(5A)、およびラット抗マウスIgG抗体(5B)(これもまた標的ペプチドを含む)によって形成される抗体マトリックスを示す。図5Cおよび5Dは、これら2つの抗体を組み合わせることによって形成される抗体マトリックスの標的領域のタンパク質分解切断の前(5C)および後(5D)を示す。

図6A~6Cは、培養プレート(6A)内の上層混濁の除去に基づくスクリーニング方法を示す。図6Bは混濁上層を有するプレートの断面図を示す。図6Cはプレート上で混濁が除去され

た領域の外観を示す。

図7A、7B、7C、および7Dは、目的とする標的領域(円形)を含むマウスIgG抗体によって形成される抗体マトリックスを示し、ここでは、抗体のFc領域はピオ

得る。

図16は、標的ペプチドベクターの略図を示す。M13K07のマップを示し、遺伝子IIIが改変された地点を矢印で示す。

図17はM13K07を標的ペプチドベクターに変換し、ペプチドコーディング配列をペプチド標的ベクターに導入するプロセスの詳細を示す。つまり、部位特異的突然変異誘発を用いて、シグナルペプチド切断部位(矢印で示す)のコードン-1および-3(図15)が各々フェニルアラニン(Phe)およびトリプトファン(Trp)に変えられる。突然変異誘発はまた、制限酵素SpeIおよびXhoIの切断部位をコードン+1および+2間に挿入するためにも用いられる。図示された突出端および標的ペプチドのコーディング配列を含むオリゴヌクレオチドは、これら2

つの制限切断部位で標的ペプチドベクターに連結される。

図18は、LAMBDA ZAPベクターからのファージミドの生成を示す。

図19は、実施例6に示す選択方法の概観を示す。

図20は、アレルギー応答におけるマスト細胞からのヒスタミンの放出を行うIgEとアレルゲンとの結合を概略的に示す。

6. 発明の詳細な説明

1. タンパク質分解抗体の調製

A. 標的ペプチドの調製

本発明の方法は、定義された標的ペプチド配列を切断し得るタンパク質分解抗体を生成するために用いられ得る：本明細書では、このような切断が可能な抗体をタンパク質分解抗体と呼ぶ。

一般に、より大きなタンパク質コーディング配列から標的ペプチドを選択するには、標的配列が物理的に切断可能であることが必要であればよい。標的ペプチドの望ましい特性としては、(i)いくつかの荷電アミノ酸の存在、(ii)一般的な親水性、および(iii)所望の特異性を導するのに十分な長さの配列が挙げられる。配列の長さに関しては、セリンプロテイナーゼに類似する特異性を有する触媒抗体が単離されるならば、認識配列はセリンプロテイナーゼの認識配列に類似するだけでよい：例えば、エラストラーゼに類似した特異性の場合は、切断部位

チンにより誘導体化され(7A)、ウサギ抗マウスIgG[F(ab')₂]が凝集し(7B)、そしてヤギ抗ウサギIgG抗体によって架橋される(7C)。その後マトリックス内の標的配列のタンパク質分解切断が起こる(7D)。

図8A~8Dは、上層上へのフィルターの配置(8A)、細菌上層内の抗体マトリックスからのピオチン(B)誘導体化Fcフラグメントの解放(8B)、誘導体化フラグメントのフィルターへの転移(8C)、およびフラグメントを含むピオチンのフィルター上での検出(8D)に基づくスクリーニング方法を示す。

図9A~9Dは、フィルター上の標的ペプチド(9A)を培養プレート上のコロニーに曝すことによって遊離アミノ基を得(9B)、そしてフィルターのアッセイ(9C)によって蛍光基による遊離アミノ末端の存在を検査すること(9D)に基づくスクリーニング方法を示す。

図10Aおよび図10Bは、一方の端部(X)は遮断され、他方の端部は蛍光リポーターにより標識された標的ペプチドの部位特異的切断の前(10A)および後(10B)を示す。

図11Aおよび11Bは、基質S₁に協働的に作用して、中間体S₂を介してシグナル産物P₁を生成する第1および第2酵素により両端部が標識されている標的ペプチドのペプチド切断の前

(11A)および後(11B)を示す。

図12は、λcroタンパク質(12A)、コリシンE1免疫タンパク質(12B)、および目的とする標的配列(12C)よりなる融合タンパク質を発現するベクターの構築を示す。12Dおよび12Eは、各々、親ベクターの切断および標的/免疫コーディング配列の挿入を示す。図12Fは最終ベクターを示す。

図13A~13Cは、標的的特異的タンパク質分解抗体を産生するブラークの選択における工程を示す。

図14は、繊維状ファージの感染サイクルを示す。

図15は、通常の遺伝子IIIタンパク質産物、およびベクターM13K07内で構築された遺伝子IIIから得られるタンパク質産物を示す。構築されたpIIIのアミノ末端は、ジグザグ線で示す標的ペプチドを切断し得る触媒抗体によって作用を受け

はX-Yである。ここで、Xは不変および非芳香性

(例えば、Ala、Val、Leu、Ile、Gly、Ser)であり、Yは非限定的である(Boehringer Mannheim, Biochemical Information)。しかし、もっと特異的な切断が所望である場合は、標的部位を構成するアミノ酸の数を増やす必要がある。

図示のために、本開示は、ヒトIgE分子を、Fab領域(抗原結合領域、図1Aおよび図1B)を、分子のFcR結合部位を含む分子のFc領域から分離するように特異的に切断し得る触媒抗体の生成について述べる。FcR結合部位は、IgE分子が細胞表面のそのレセプターに付着する部位である(セクションII参照)。Fcレセプター結合ドメインが残基301~376内にあることは既に決定されている(Helmら、1988)(図2および図3参照)。この領域での切断はレセプターの結合活性を破壊する(Helmら、1988)。

有用な標的配列を選択するために、タンパク質の一次および二次構造を調べた。ヒトIgE H鎖の構造を図2に示す。図2から分かるように、IgE H鎖の定常領域には2つの領域(IおよびII)がある。これらの領域では、H鎖内部ジスルフィド架橋の位置により、切断によりFabをFcR領域から分離することが可能である。これらの2つの領域のアミノ酸配列を図3に示す。領域IおよびIIを下線で示す。

IgE分子内の他の切断部位は、切断の最終結果が、抗原結合領域のレセプター結合領域からの分離である限り、潜在的に有用である。触媒抗体は、循環IgE分子およびレセプター結合IgE分子の両方を切断する。Fc結合領域内の循環IgE分子を切

断し、次にIgEのマスト細胞との結合を防ぐ触媒抗体もまた選択され得る。

目的とするタンパク質は、コンピュータ支援配列分析および比較を用いることによって様々な特性が検査され得る。例えば、配列は、抗原部位を検索することによって(ANTIGENプログラム、Intelligenetics, Mountain View CA; Hoppらの方法に基づく)、または標準的な水治療(hydrophobicity)分析を行うことによって(SOAPプログラム、Intelligenetics; Kleinらの方法に基づく)可能性のあ

る標的部位をスキャンすることができる。抗原部位はタンパク質の表面に得られる部位であることが多い。さらに、標的タンパク質を他のタンパク質から区別する最小配列は、配列比較（例えば、SCANSIMプログラム、Intelligenetics; Needlemanらの方法に基づく）によって決定され得る。この方法は、IgE分子の標的領域IIの分析に適用した。ANTIGENプログラムにより、可能性のある抗原部位として、EDSTKKCAを含む領域を同定した。次にこの8アミノ酸の配列を、SCANSIMプログラムを用いて、SWISS-PROTデータベースで入手可能なタンパク質配列と比較した。最も近いタンパク質は、4つのアミノ酸位置（KKCA）のみでこの配列と一致することが分かった。この結果により、EDSTKKCA 8-merを標的配列として使用することにより、切断に利用可能であると共に、ヒトIgE分子に対する良好な特異性があることが示唆される。

B. ライブラリークローン由来のIgE Fabフラグメントの発現

Fabフラグメントの組み合わせライブラリーは、本質的にHuseらの方法に従ってλファージで生成される。この方法を用いると、所望の特異性の抗体を発現するクローンのための標準的な方法によって、大きなライブラリーが直接スクリーニングされ得る。この方法によれば、遷移状態を合成する必要がなくなり、可能な抗体数が大きく増大する。さらに、これらのライブラリーは、供給源である動物より広い多様性を発現する可能性を有する。例えば、個々のヒトの免疫レパートリーでの異なる抗体数は約 10^6 であると推定されている。免疫グロブリンクローニング方法により、インビボでは通常起こらないH鎖およびL鎖のランダムな組み合わせおよび結合が可能になるため、 10^6 個にも及ぶ個々のクローンが得られ得ると理解される。従って、これらのライブラリーは、インビボでは存在しない抗体をインビトロにおいて創生する可能性を提供し、これにより、潜在的な触媒抗体の範囲が増大する。

組み合わせライブラリーの構築の一般的な方法を実施例1に示す。また、必要なベクターを図4に示す。つまり、免疫グロブリンL鎖のためのコーディング配列、およびH鎖のVHおよびCH1ドメインは、適切なmRNA源からインビトロで増幅される。mRNAのための適切な供給源には、あらゆる種の様々な組織のいずれから

のスクリーニングが開発された。この場合も、IgE標的がモデルシステムとして用いられる。

目的とする触媒抗体は、抗原結合ドメインとレセプター結合ドメインとを分離するようにIgE分子のFc領域を切断しなければならない。以下の方法は、上記で生成された組み合わせライブラリーを、目的とするIgE領域を切断し得る抗体の存在について迅速にスクリーニングするのに用いられ得る方法について述べる。

A. 混濁重層

第1のスクリーニング方法は、混濁上層の透明化（clearing）に基づいて、目的とする触媒抗体に対応するクローンを検出する。第1のスクリーニングの1つの好適な実施態様では、組換えマウス抗ラットIgG免疫グロブリン分子およびラット抗マウスIgG免疫グロブリン分子が目的とする標的ペプチドのための媒体として用いられる。標的ペプチドは、図1に示すバ

イン切断部位にはほぼ対応するIgG分子のヒンジ領域の真上に挿入される。

標的ペプチドコーディング配列は、オリゴヌクレオチド合成の標準的な方法によって直接に、または、標的配列が大きい場合には、合成と連続クローニングとを組み合わせた方法（実施例2）のいずれかによって合成され得る。

IgE切断に特異的な触媒抗体に対してスクリーニングするために、標的領域Iのフラグメントがスクリーニングの一例として選択された。標的領域は以下のアミノ酸配列、ILQSSCDGGGHFPPTIQLL（一文字コードによる）を有する。このペプチドをコードする核酸配列は、生成された完全な標的領域のコーディング配列に対応する多数のオリゴヌクレオチドフラグメントの縦列アレイを生成することによって、一連のクローニング工程において構築される。最終産物はクローニングベクターから切り出され、そして標的配列は、バイン切断部位として図1に示した領域内のH鎖マウス抗ラットIgGクローンをコードする遺伝子に挿入される（mIgG/e）。ラット抗マウスIgGにおいて標的配列を挿入するためにも同じ操作が実施される（rIgG/e）。これらの組換え構築物は次に骨髓腫細胞にトランスフェクトされ、IgE切断標的配列を有する完全なmIgG/eおよびrIgG/e分子を生成する（mIgG/eは図5A、rIgG/eは図5B）。

でも得られるBリン球またはプラズマ細胞、例えば、マウス脾臓細胞またはヒト末梢血液リンパ球が

含まれる。当然ながら、免疫グロブリンL鎖の選択はmRNA源として選択された種に依存する。例えば、ヒト、マウス、およびウサギのmRNA源では、L鎖はκ鎖およびλ鎖よりなる群から選択される。増幅プライマーのための配列は、既知のL鎖、VH配列およびCH1配列から選択される（Kabatら）。プライマーは標準的なオリゴヌクレオチド合成方法によって合成される。

次に増幅産物がλベクターにクローニングされて、この結果、L鎖ライブラリーおよびH鎖ライブラリーが生成される。実施例1は、マウスγH鎖およびマウスκL鎖を用いる発現ライブラリーの創生について記載している。次に2つのライブラリーを特定の制限酵素切断部位で交差させて、組み合わせFab発現ライブラリーを生成する。インビトロにおいてファージはパッケージされ、次にプレートされる。

発現ベクターの性質により、組み合わせFabフラグメントが細菌によって分泌される。従って、プレート化ファージは以下に述べるスクリーニング方法のためのテンプレートとして働く。

ライブラリーは、2つの抗体、一方はH鎖に対する抗体、他方はL鎖に対する抗体、を用いる二重ブラークリフトフィルターをスクリーニングすることによって、組み合わせFabフラグメントを効果的に発現しているブラークの割合についてスクリーニングされる。両方の鎖の発現に対してポジティブとなるブラークは、潜在的に有用なFabフラグメントを発現す

るものとして計数される。

II. 定義された配列特異性を有する触媒抗体を同定するためのスクリーニング方法

上記の方法によれば、幅広い多様性を有する多数の抗体分子の生成が可能となる。次の工程は、目的とする触媒抗体、すなわち、定義された標的ペプチド配列を切断し得る抗体を同定する手段を提供することである。この目的のために以下

組換えマウス抗ラットIgG/e分子およびラット抗マウスIgG/e免疫グロブリンは、液体として維持される個々の軟寒天上

層中に混合される。mIgG/e混合物にrIgG/e軟寒天溶液が添加される。第1の軟寒天溶液は、複合体/凝集体の形成が得られるまで第2の溶液により滴定される（図5C）。

最終的な軟寒天ミックスが、ファージ/ブラーク組み合わせライブラリーの試験プレート上に重層される（図6A）。標的ペプチド配列を切断する抗体により、組換え分子が3つの部分に分かれ、これにより、マトリックスが完全に壊れる（図5D）。抗体マトリックスの崩壊により、混濁層であるはずの層に容易に見られる透明ブラークを形成する（図6C）。

他の部位で免疫グロブリン分子のいずれかを切断するほとんどの触媒抗体は、免疫複合凝集体を部分的にしかまたは全く分解しない。従って、これらの抗体は所望の特異性を有する抗体から区別される。

同じ種類の混濁マトリックスは、抗体（IgA、IgG、IgEなど）のいかなる組み合わせを用いることによって形成され得る。この結果、必要な架構が得られる（例えば、図5C）。さらに、目的とする標的配列を含むタンパク質の沈降を生成し得る他の方法、例えば加熱または化学的架構もまた、混濁上層の生成に適用可能である。

本実施態様は、IgEペプチドについて述べたように、供給源に関係なく、目的とするいかなる標的ペプチドもが同じ部位に挿入され得る一般的なスクリーニング方法として、幅広い適用を有する。

第1のスクリーニング方法の別の実施態様では、ファージ

産生抗体のブラークを有するプレートの上にIgEの凝集体を含む寒天層を重層し、混濁層を形成する。凝集は様々な手段によって達成され得る。凝集の1つの好適な方法は、抗体を有するIgE分子を、2つの異なるIgE領域、例えばウサギ抗ヒトIgE/Fcおよびウサギ抗ヒトIgE/Fabと架構することである。IgE分子自体は、ヒト骨髓腫血清から単離されるような天然に存在するIgEであり得る（Ishizakaら

）か、または、IgE分子はマウスの腹水としてハイブリドーマから組換えにより産生され得る。

B. 診断リポーターの放出

第2のスクリーニング方法は、触媒抗体による目的とする標的配列の切断によって支持体から診断リポーターを放出することを含む。このスクリーニングでは、標的ペプチドは、酵素、ビオチン、または放射性標識のようなリポーター分子と結合される。標的分子は次に支持体上に固定化される。リポーター分子は次に、触媒抗体が標的ペプチド配列を切断するとき放出される。リポーター分子が放出されるだけで検出が可能である。

実施例3は、抗体マトリックス結合リポーター分子の放出を利用する第2のスクリーニングの2つの実施態様について述べている。第1の方法は上述の第1のスクリーニングに非常に類似しているが、異なる点は、mIgG/eおよびrIgG/e分子のFc部分が抗体格子（図5C）の形成前にリポーター標識されることである。分子のFc部分の標識については以下に説明する。

第2の方法では、組換え産生マウス抗ラットIgG分子が単離され（実施例2）、これはIgE領域（図3）を含む（この分子は引き続きmIgG/eと呼ばれる）。次にIgG/e分子のFc部分が標識される。IgG/e分子のFc部分を標識するには多くの方法が利用可能であり、以下を含む：(i) IgG/e Fc領域への結合に特異的な酵素標識抗体またはFabフラグメント；(ii) ビオチン化または放射性標識などによるIgG/e分子の直接標識。実施例3は、ビオチンによるIgG/e分子の炭化水素基の標識について記載している（図7A）。

第2の方法では、一緒になって抗体分子の凝集体を形成する標識されたmIgG/eおよびウサギ抗マウスIgG[F(ab')]₂を含む軟寒天上層溶液が調製される（図7B）。これらの凝集体を架橋させて抗体マトリックスを形成するために、この溶液は、沈降が形成し始めるまで、ヤギ抗ウサギIgG溶液で滴定される（図7C）。

次に、上記の方法のいずれかによって生成された抗体マトリックスを含む軟寒天溶液を、組み合わせライブラリーによって生成されるブラークの上に重ねる（図8B）。放出されたリポーター分子に結合するのに効果的なフィルター、この場

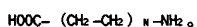
り、スクリーニングのために改変され得る。各々が少なくとも1つのリジンを含む2つの完全な試験ペプチドに加えて、例えば、ペプチドIからはILOSSCDGGGHFPPTIQLL、およびペプチドIIからはCADSNPRGVSAVLSRPSの、リジンを含まない切り形ペプチドが試験され得る。

ペプチドのフィルターへの非共有結合（実施例3）は、リジンアミノ基が遮断されるのに加えて、ペプチドのアミノ末端がアセチル化されることもまた必要とする。共有結合では、遊離アミノ末端を有するペプチドがImmobilon AV膜（Millipore）に容易に共有結合され得る（実施例3）。

ペプチドはインビトロで合成されるか、または組換えにより産生され得る。組換え産生では、所望のペプチドのためのコーディング配列が、当業者に公知の多くの発現ベクターのいずれかに導入され得る。次にペプチドが、組換えにより産生され単離され得る（Maniatisら、Ausubelら）。

このスクリーニングの別の実施態様では、標的ペプチドと

フィルターとの間にスパーサー分子を導入する。スパーサーアームにより、標的ペプチドを潜在的な触媒抗体に異なるように提示することが可能である。スパーサー分子のための主な要件は、(i) 反応アミノ基を含まないこと、(ii) 一方の端部がフィルターに付着し得ること、および(iii) 他方の端部が標的ペプチドに付着し得ることである。このようなクラスの分子の1つは、アフィニティークロマトグラフィーで用いられる標準的なスパーサーアームの基である。この目的に適したスパーサーアームは、例えば、Pharmaciaから広く入手可能である。本出願のための代表的なスパーサーアームは以下の構造を有する：



リンカーのアミノ末端は、ペプチドのアミノ末端付着を行うについて記載されるように（実施例3）、または、例えば、フィルターと反応する前にアミノ基のCNBr活性化によって、フィルターに付着される。次にカルボキシル末端が、典型的にはカルボジイミドを用いて標準的な方法により活性化される。標的ペプチドのアミノ末端が、次に、活性化されたカルボニルに結合される。

標的ペプチドが組換えにより発現されるとき、ポリ（GlyAlaLeu）のようなス

合にはGENESCREENまたはニトロセルロースフィルターを軟寒天の上に重ねる（図8Aおよび図8C）。プレートは37℃に置き、湿潤インキュベーター内で一夜インキュベートする。

次にフィルターが、リポーター分子の存在についてアッセイされる。本実施態様では、触媒抗体による標的配列の切断（図7D）の結果として、抗体マトリックスから放出されるビオチン／タンパク質複合体が転移フィルターに結合する。次にフィルター上のタンパク質／ビオチン複合体の存在が標準的な方法によって検出される（Ausubelら；Pierce-Product Catalogue；図8D）。

第1のスクリーニング方法の考察において上述したように、抗体の多くの組み合わせが、抗体マトリックスを生成するために利用され得る（例えば、IgA、IgG、IgE）。

第2のスクリーニング方法の別の実施態様においては、リポーター分子が標的配列を介してフィルターに結合される。フィルターは組み合わせライブラリーによって生成されるブラークの上に重ねられる。標的配列を切断するファージによって発現される触媒抗体が、リポーター分子をプレート表面に放出する。次にリポーターはプレート上で直接、またはプレートから第2のフィルターへの転移によって検出される。

C. 蛍光プローブの使用

第3のスクリーニング方法は、蛍光プローブを用いた、触媒抗体によって遊離される遊離アミノ基の検出を含む。この方法の概略を図9に示す。この方法は、標的ペプチドによる膜フィルターの被覆を含み、標的ペプチドのアミノ末端は合

成の間にまたはフィルターへの結合を介して遮断される。膜フィルターは、非共有結合または共有結合のいずれかを介して試験ペプチドにより被覆される（実施例3）。可能ならば、試験ペプチド配列を選択するときリジンは避けるべきである。さもなくば、リジンのアミノ基は、アセチル化のような誘導体化を行う必要がある（K. LubkeおよびE. Schroder, Annalen der Chemie, 692:237 (1966)）。従って、本発明の好適な試験ペプチド（図3、下線の配列）は、このスク

パーサー分子をコードする配列が発現ベクターに組み込まれ得る。この反復配列は次に、フィルターと標的ペプチドとの間のスパーサーとして働く。もしくは、標的ペプチドのマルチマーをコードする配列が発現ベクター

に挿入し得る。標的配列のマルチマーを用いることによって、スパーサー分子配列のみを切断して標的配列は切断しない無関係の触媒抗体を検出する可能性が減少する。

次にペプチドで被覆したフィルターを試験プレート上に重ね、37℃でインキュベートする。この間に、所望の活性を有する触媒抗体が、結合されたペプチドを切断し、これにより新しいアミノ末端が生成される。次にフィルターは、遊離アミノ基と反応し呈色反応を生成する蛍光プローブ（実施例3）のようなプローブ化合物で処理される。呈色反応は、プローブとポジティブな反応を示すフィルターの領域を示す。次にポジティブシグナルを生成する対応するブラークが同定される（図8D）。この方法は、いかなるもの供給源からの様々な標的ペプチドにも適用可能であるという利点を有する。

D. 2 酵素検出システム

第4のスクリーニング方法は、標的領域によって互いに近接して保持されるとき2つの反応を連続して引き起こす2つの酵素を用いることを含む。標的ペプチドはリンカーとして機能する。上記の2つの酵素がリンカーの切断によって物理的に引き離されるときは、第3の酵素が上層内に用いられ、第1の反応によって生成される基質を用いて検出可能な産物を生成する。

このスクリーニングの1つの実施態様は、3つの酵素、オキシダーゼ、ペルオキシダーゼ、およびカタラーゼを用いる。

つまり、このスクリーニングは、目的とする標的配列を含む結合ペプチドを介してオキシダーゼ（E₁；図11A）をカタラーゼ（E₂；図11A）に共有結合させることを含む。この結合ペプチドは2つの酵素を密接した位置に保持する（図11A）。オキシダーゼ-標的-カタラーゼ複合体、ペルオキシダーゼ、および色素（単一の色素または結合色素システムを意味する）を含有する軟寒天上層が形成される

。色素は、 H_2O_2 の存在下でペルオキシダーゼによって、特有の呈色シグナル反応産物に変換される。ペルオキシダーゼ酵素は、セイヨウワサビペルオキシダーゼ、ミエロペルオキシダーゼ、またはラクトペルオキシダーゼのような過酸化水素オキシドレダクターゼであり、以下の反応を引き起こす：



ドナーに対するペルオキシダーゼの特異性は一般に低く、多くのフェノール、アミノフェノール、ジアミン、およびインドールフェノールが活性である。本発明では、ドナーは、ペルオキシダーゼ触媒酸化の結果として検出可能な、代表的には発色性の反応産物に反応する様々な既知の化合物または化合物ペアの間で選択される。

ドナー化合物の例としては、0-フェニレンジアミン、アミドピリン、およびナフタレン-2,3-ジカルボキシアルデヒドが含まれる。着色反応産物の代表的な形成には、ダイマー形成、例えば、4-アミノアンチピリンおよび2,4,6-トリプロモ-3-ヒドロキシ安息香酸 (Boehringer Mannheim) が含まれる。

組み合わせライブラリーを含むファージが上に置かれた上記のプレートの上に寒天が重層される。オキシダーゼに対する基質の存在下でオキシダーゼは基質 (S_1 ; 図11A) と反応し、過酸化水素 (H_2O_2) を生成する。次に H_2O_2 はカタラーゼによって、 H_2O_2 (S_2 ; 図11A) を $2H_2O + O_2$ (S_3) に変換するために用いられる。標的ペプチドの切断に対して特異的である触媒抗体による E_1 および E_2 を結合する標的ペプチドの切断の結果、2つの酵素は物理的に分離する (図11B)。これにより、同様に上層内に存在するペルオキシダーゼは色素を検出可能な形態に変換する機会を有する。ペルオキシダーゼの濃度は、反応条件を最適化して、ポジティブ色素シグナルの検出が可能となるように測定され得る。

適切なオキシダーゼの1つはDアミノ酸オキシダーゼである。ブタのDアミノ酸オキシダーゼは *E. coli* の発現ベクターにおいてクローニングされている (Ciccarelli)。Dアミノ酸オキシダーゼ遺伝子の3'末端で、目的とする標的配列をコードするオリゴヌクレオチドが標準的な組換え操作によってインフレームで挿入される (Ausubelら; Maniatisら)。次に組換えタンパク質がCiccarelliら

の細菌が標的ペプチドを切断し得る触媒抗体を分泌する場合は、ポジティブ色素シグナルが生成される。

化合物の相対濃度は、軟寒天上層に添加される連続希釈濃度のペルオキシダーゼを用いてポジティブ色素反応を測定することによって、ポジティブブラークの検出を可能にするように最適化される。ペルオキシダーゼの濃度は、密集したポジティブ色素シグナルがプレートを覆う場合と、(特異的触媒抗体がないため) 検出可能なポジティブ色素シグナルがプレート上にない場合との間の遷移濃度に最適化される。

ポジティブシグナルに対応するブラーク領域が、目的とする触媒抗体をコードするファージを含有する特定のブラークを同定するために、回収され、再プレートされ、そして再アッセイされる。

表1は、上記で使用したDアミノ酸オキシダーゼの代わりに用いられ得る基質/オキシダーゼの組み合わせのいくつかの例を示す。オキシダーゼ酵素によって認識される基質を生成する他の酵素は、これらが色素検出システムを妨害しない

限り、上層内に含まれ得る。例えば、コレステロールエステラーゼは、エステル化形態のコレステロールを遊離コレステロールに変換するために含まれ得る。このコレステロールオキシダーゼは次に基質として用いて、酸素の存在下でコレステノンと H_2O_2 とを生じる。

表1

基質	オキシダーゼ
グルコース	グルコースオキシダーゼ
尿酸	ウリカーゼ
アミノ酸	アミノ酸オキシダーゼ
コレステロール	コレステロールオキシダーゼ
L-グリセロール-3-	L-グリセロール-3-リン酸
リン酸	オキシダーゼ
サルコシン	サルコシンオキシダーゼ

E. 発色または蛍光発光基質の使用

の方法によって単離される。

本発明では、標的配列は典型的にはペプチドIまたはIIのいずれかにより構成され得る (図3)。さらに、標的配列に加えて、他の外延配列が存在して長い結合ペプチドを提供し得、これは、切断のための標的配列の利用可能性を阻害する

立体的な複雑さを低減するのを助ける。例えば、このような外延配列の1つはポリペプチドのポリ (Gly Leu Ala) をコードし、以下のように用いられ得る：

(GLA) \times SRDFTPTVKILQSS (GLA) \times C。

融合タンパク質のカルボキシ末端は付加システイン残基を有し、チオールが第2の酵素に架橋するのを可能にする (下記参照)。結合ペプチドのためのコーディング配列は、対応するIgEコード化領域および合成オリゴヌクレオチドとして付加される外延配列に完全に由来し得るか、または、完全な配列が合成により生成され得る (Ciccarelliら; Crea; Yoshioら)。

次にカタラーゼが、オキシダーゼ/標的融合タンパク質の末端システインのチオール基とカタラーゼのアミノ末端との間の架橋を提供する適切なヘテロ二官能性架橋剤を用いて誘導体化される。適切なヘテロ二官能性架橋剤としては以下のものが含まれる：スルホ-m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシルホスホスチンイミドエステル (スルホ-MBS)；スルホスチンイミジル (4-ヨードアセチル) アミノベンゾエート (スルホ-SIAB)；およびスルホスチンイミジル4-(N-マレイミドメチル) シクロヘキサン-1-カルボキシレート (スルホ-SMCC)。上記の架橋剤のすべておよびこれらの示唆された反応条件はPierce (Rockford, IL) から入手可能である。例えば、カタラーゼ (Boehringer Mannheim) はpH7.0でスルホ-SIABと複合体化される。次にスルホ-SIAB-NH-カタラーゼ複合

体がオキシダーゼ/標的融合タンパク質にpH7.5で添加され、この結果、融合タンパク質をカタラーゼに結合させる安定したチオエーテル結合が形成される。

オキシダーゼ/標的/カタラーゼ複合体は次に、色素およびペルオキシダーゼ (Boehringer Mannheim) と共に軟寒天上層 (Maniatisら) に添加される。軟寒天ミックスは組み合わせライブラリーを表すブラークの上に重層される。感染し

第5のスクリーニング方法は、分析による発色または蛍光発光基質を用いて標的ペプチドの切断を検出することを含む。このスクリーニングは、SmithおよびGargiuloらによって開示された方法に基づく。ペプチドIまたはII (図3) のような目的とする標的ペプチドは、そのアミノ末端で、例えば、カルボベンゾキシ基 (Gargiuloら) を用いた誘導体化によって保護される。次に発色または蛍光発光基を標的ペプチドの力

ルボキシ末端に付着させる (Smith, Gargiuloら)。次にこれらの化合物はタンパク質分解活性を有する触媒抗体のための基質として働く。

発色基質スクリーニングにおいては、代表的な発色基は4-メトキシ-2-ナフチルアミンである (Smith)。発色基で誘導体化されたペプチドが緩衝液-軟寒天に添加される (Jones; Jonesら)。軟寒天は組み合わせライブラリーを表すブラークの上に重ねられる。これらのプレートは37°Cで一晩インキュベートされる。次にプレートをジアゾニウム塩溶液に浸漬する (Jones; Jonesら)。ペプチドを発色基から切断し得る触媒抗体の存在下では、発色基はジアゾニウム塩と反応してアゾ色素を形成する。アゾ色素によって生成される強い色は目視により容易に検出される。ポジティブシグナルに対応するブラーク領域が、目的とする触媒抗体をコードするファージを含む特定のブラークを同定するために回収され、再プレートされ、そして再アッセイされる。

蛍光発光基質スクリーニングにおいては、代表的な蛍光発光基は5-アミノインフル酸ジメチルエステルである (Gargiuloら)。上述のように、蛍光発光基で誘導体化されたペプチド (図10A) が軟寒天上層に添加される。プレートは37°Cでインキュベートされ、遊離した蛍光発光基 (図10B) が存在するかどうか紫外光ボックス (Fotodyne, New Berlin, WI) 上で定期的に検査される。上述のように、ポジティブシグナルに対応するブラーク領域が、目的とする触媒抗体をコードす

るファージを含む特定のブラークを同定するために回収され、再プレートされ、および再アッセイされる。

F. 標的配列を含む酵素の使用

第6のスクリーニング方法は、標的ペプチド配列を選択し、利用可能なタンパク質データベースを検索して相同配列を含む酵素を同定することを包含する。相同配列は、例えば、PCGENE SCANSIMプログラム (Intelligenetics, Mountain View, CA) を用いることによって決定され得る。SCANSIMプログラムは、5〜30個の間のアミノ酸を有するリファレンス配列と既知のタンパク質および酵素配列のライブラリーとの間のタンパク質配列の類似性を検索する。プログラムは、全く同一であることを必要とせず、Dayhoffマトリックスに基づくいくつかの置換も可能とする (Needlemanら; Dayoffら; Doolittle)。標的ペプチドに類似する配列を含むタンパク質/酵素が完全に一致しない場合は、標準的な突然変異誘発方法 (Ausubelら; Maniatisら) によってインビトロで操作して、全く同じ標的ペプチド配列を含むようにする。

本来の標的ペプチドの代わりに配列比較によって同定されるタンパク質/酵素を用いる利点は、以下を含む: (i) このタンパク質/酵素は目的とする標的タンパク質より容易に入手可能である; および (ii) このタンパク質/酵素は、触媒抗体による切断により得られる容易に検出可能な表現型を有し得る。

上記のスクリーニング方法のいずれにおいても、試験プレートの領域がポジティブであるとして同定された後は、この領域内に位置するブラークが取り出され、より低い密度で再プレートされる。その後、スクリーニングが繰り返され、ポジティブブラークの選択を確認する。

III. 定義された配列特異性を有する触媒抗体を同定するための選択方法

上記のスクリーニング方法に加えて、目的とする触媒抗体を発現するファージを含む細菌もまた、遺伝子選択方法によって同定され得る。遺伝子選択方法は、目的とする候補のみが成長し得る条件が与えられるという、スクリーニングに勝る重要な利点を提供する。従って、通常は低い頻度で生じる目的の候補が、選択によればスクリーニングによって行うより容易に同定され得る。

A. 第1の選択方法

本発明の触媒抗体は、本質的には実施例5に述べるように選択され得る。まず

成は行われない。疎水性の第2のタンパク質を用いる別の利点は、タンパク質の疎水性により、その配列のうち、抗体による可能な切断に対し基質として提示される部分が少ないことである。

本選択方法において使用するのに適した特に有用なλ遺伝子の1つは、cro遺伝子である (Gussinら)。croタンパク質はダイマーとして機能して、λゲノムの初期転写を制御する。従って、croタンパク質はDNAに結合して別のcroタンパク質と相互作用しなければならない。croタンパク質の機能は溶菌進展にとって必要である。本選択方法において用いられ得るλcro遺伝子には利用し得る多くの条件突然変異がある。例えば、cro遺伝子の抑圧アンバー突然変異は、温度感受性tRNAサプレッサーを有する宿主のE. coli株を有することによって温度条件性とされ得る (例えば、Hussainら)。cro遺伝子のアンバー突然変異体を有するλファージが、温度感受性tRNAアンバーサプレッサーを有するE. coliのプレート化株にトランスフェクトされる場合、ファージは、42℃ではなく32℃でブラークを形成し得る。さもなくばファージは野生型であり、すなわち、成長のためにsupEの存在を必要としない。突然変異親ファージは、標準的な遺伝子操作によって、または部位特異

的オリゴヌクレオチド突然変異誘発によって生成される。改変されたλベクター内に組み合わせライブラリーを生成することについては、実施例5Aに概略を示す。

実施例5Bは上述の選択の1つの適用例を示す。cro遺伝子産物のためのコーディング配列は、標準的な方法によって改変され、末端HindIII (5') およびXbaI (3') アダプターを有する (実施例4B、図12A)。この配列は、例えば、pUC19ベクターのポリリンカーにクローニングされる。第2のタンパク質として、113アミノ酸内膜タンパク質コリシンE1免疫 (colE1 imm) についてのコーディング配列が選択される (Goldmanら)。コーディング配列は、末端EcoRI およびXmaIアダプターを各々その5' および3' 末端に有するように改変される (図12B)。合成標的配列 (1LSSCDGGGHFPPTIQLL; 実施例2) は、XbaI およびEcoRI制限酵素によりpUC19ベクターから切り出される (図12C)。

、組み合わせライブラリーが、λの溶菌の進展にとって不可欠な温度条件欠陥遺伝子 (temperature conditional-defective gene) を有するように遺伝子的に改変される親λベクター内に構築される。いかなるものλまたは宿主特異的遺伝子、例えば、初期遺伝子N、cro、O、P、またはQのいずれもが、この容量で機能し得る (Gussinら)。

本選択方法が機能するためには、触媒抗体はどうかして非許容条件下で溶菌成長に必要な遺伝子産物を供給することができなければならない。選択の1つの実施態様では、条件欠陥遺伝子の野生型コピーが、標的配列架橋を介して第2のタンパク質にインフレームで融合される必要がある: 標的配列は所望の触媒抗体の切断部位である。第2のタンパク質はどうかして、必要な野生型タンパク質がその通常の細胞機能を行うのを妨げることができなければならない。溶菌成長に必要な野生型タンパク質を生成する唯一の方法は、標的領域において融合タンパク質を切断して野生型タンパク質を遊離させることである。野生型のタンパク質を不能にする方法はいくつかあり、次のものが含まれる: (1) 複合体中で機能するタンパク質を、複合体形成を妨害する第2のタンパク質配列に融合する方法; および (2) 遺伝子産物を通常の作用部位から隔離する方法。野生型タンパク質の不能化は、融合の第2のタンパク質成分によって行われる。アミノまたはカルボキシ末端伸長が存在するだけで、野生型タンパク質を不能にするのに十分である場合がある。しかし、第2のタンパク質の不能効果は、例えば、必要な野生型タンパク質に融合するために極疎水性タンパク質のコーディング配列を選択することによって悪化する。この場合、融合タンパク質は、疎水性の第2のタンパク質領域によって、膜結合、またはミセル形成に類似した方法でクラスター形成するように導かれる。触媒抗体による標的配列架橋の切断によって、必要な野生型タンバ

ク質が遊離し、溶菌サイクルにおいてその機能を実行し、これにより生存能力のあるファージの生成およびブラークの形成が行われる。切断が起こらないときは、すなわち、必要な野生型タンパク質が全く利用できないときは、ブラークの形

pUC/croベクターはXbaIおよびXmaIで二重に切断される (図12D)。標的配列およびcolE1 immコーディング配列はベクターに連結され、その結果、croタンパク質、標的領域、およびcolE1 immタンパク質間でインフレーム融合が得られる (pUC/cro/mem; 図12Eおよび図12F)。

pUC/cro/memベクターは次に、温度感受性アンバーリプレッサーを含むλプレート化株に導入される。pUC19ベクターの特徴的なアンピシリン耐性を有する形質転換体を選択される。これらの標準的なクローニング操作に対しては、当業者

知のいかなるものクローニングベクターでも用いられ得る。有用な改変の1つは、融合タンパク質コーディング配列を、例えば、Fプラスミド (Mieschendahlら) に導入することであり、これにより、融合タンパク質コーディング配列を細菌プレート化株内に維持するための薬剤選択の必要がなくなる。もしくは、融合構築物が細菌ゲノムに導入される。異なる細菌プロモーターを利用して、選択の構築に依存して融合タンパク質産生のレベルを増減させ得る。

組み合わせライブラリーをプレートするのに用いられる、目的とするタンパク質融合のためのコーディング配列を含むクローニングされたプレート化株については、実施例5Aに述べる。ライブラリーのプレート化効率は許容温度で試験され、ファージストックは、以下のブラーク形成単位のプレート当たりの最終濃度、すなわち 10^7 、 10^6 、 10^5 、を生じるように希釈される (図13A)。次にこれらのプレートは、必要な野生型タンパク質、croが融合タンパク質構築物から遊離されない場合は、溶菌成長にとって非許容の温度でインキュベートされる (図13B)。次にプレートは、ブラークの存在について試験される (図13C)。

目的とする触媒抗体を同定することに加えて、選択は、温度条件感受性cro遺伝子の真または偽の復帰を釣り上げ得る。これらの可能性を識別するために、ブラークが釣り上げられ、以下の2つのプレート化株にトランスフェクトされる:

- (i) pUC/cro/memベクターを有さない細菌株、および、
- (ii) pUC/cro/memベクターを有する細菌株。pUC/cro/memベクターが存在しない場合にプラ

クを生成し得るファージは、野生型にcro機能を提供するために、ベクターによってコードされる融合タンパク質に明らかに依存しない。一方、pUC/cro/memベクターの存在下のみでブラックを生成するファージは、さらに分析を行うために選択される。

選択の特異性は、溶菌進展にとって不可欠の2つの遺伝子における条件突然変異体を用いることによって増大し得る。λゲノムからこの選択のために選ばれるいかなる遺伝子も、λゲノムの全配列が既知であるため、インビトロで容易に操作され得る。λはさらに、抑圧致死突然変異および温度感受性突然変異を含む、多くのタイプの条件突然変異が利用可能であるという点で有利である。例えば、cro遺伝子を利用する上記の選択は、Nulにおける第2の条件突然変異と組み合わせられ得る。Nulはパッケージングのためのλゲノムの適切な切断のために必要である。この切断機能は、Nulタンパク質とAタンパク質との間で形成される複合体であるファージターミナーゼ酵素によって実行される。

Nul遺伝子においては多くのアンバー突然変異が利用可能である(Weisbergら)。アンバー-Nul突然変異は、cro突然変異に対して上述したように親ファージに導入される。便宜上、親ファージは通常のサプレッサー保持宿主(SupE保持株など)において継代され得る。Nul-標的架構第2タンパク質融合をコードする核酸配列が生成される。次に融合タンパク質をコ

ードする配列の両方が、温度感受性tRNAアンバーサプレッサーを有するプレート化宿主細胞株に導入される。次に組み合わせライブラリーが上述のようにプレートされる。

もしくは、croおよびNulタンパク質が、標的架構ペプチドによって互いに融合され得る。croおよびNulペプチドは、生産的な溶菌感染を得るには完全なままで維持されなければならないため、ブラックを生成し得る生存可能なファージの生成にはブリッジペプチドのみの切断を必要とする。

融合タンパク質の第2のタンパク質配列は、いかなるもの膜タンパク質またはより短い疎水性配列であり得る。場合によっては、第2のタンパク質としての高荷電ペプチドが、必要な野生型の遺伝子機能をより効果的に妨害し得る。

ラリー(実施例6、図)と共に宿主細胞株に同時形質転換される。形質転換は、エレクトロポレーションを含む多くの標準方法によって達成され得る(Ausbelら)。欠陥pIIIペプチドの切断がないときは、ファージ粒子は集合して分泌されるが、感染性はない。M13K07はカナマイシン耐性決定基を有するため、ベクターで形質転換された細胞が選択され安定して維持され得る。

ペプチドベクターと抗体をコードするファージミド(図4、図18、および図19)との両方で形質転換される細胞では、2つの構築物は互いに助け合う潜在能力を有する。ペプチドベクターはファージ集合に必要なすべての遺伝子を含み、従って抗体コードファージミドDNAをファージ粒子にパッケージングするのを援助し得る。次に、抗体をコードするファージミドが、標的ペプチドを切断し得る触媒抗体のための遺伝子を有する場合は、これはpIII機能を回復し得、この結果、感染性ファージ粒子が生成される。上述のように、pIIIは周辺腔に突出することが知られている。周辺腔はまた抗体集合の位置であることもまた知られている(Betterら、Skerraら)。

適切なインキュベーション期間の後、培地から回収した感染性ファージは、ペプチドベクター、または所望の特異性およびタンパク質分解能力を有する抗体をコードする遺伝子を有する抗体コードファージミドのいずれかを含む。ファージミドゲノムDNAは、それ自体のDNAのパッケージングよりファージミドDNAのパッケージングを好むM13K07の特性の結果として

てファージ粒子に優位に組み込まれる(Vieiraら)。ファージミドベクター(適切な触媒抗体をコードする)およびM13K07ベクターの両方が同じ細胞内に存在するときのみ、ファージはブラックを提供する。

上述の選択方法は、目的とするいかなる標的ペプチド配列との使用に対しても容易に適用され得る。

図14は、アレルギー応答におけるマスト細胞からのヒスタミン放出を行うIgEとアレルゲンとの結合事象を概略的に示す。

IV. 特異性試験

上述のスクリーニングおよび選択方法を用いる、目的とする触媒抗体をコード

B. 第2の選択方法

本発明の第2の選択方法はまた、定義されたペプチド標的配列を切断し得る触媒抗体の選択を提供する。本方法では、ファージ産生に不可欠のタンパク質が特定の標的部位で切断される場合、細菌は、感染性ファージ粒子の増殖のみを支持し得る欠陥ヘルパーファージにより感染される。組み合わせライブラリーコード化Fabフラグメントは、同じ宿主細胞に独立して導入されるファージミド上で発現される。この抗体ライブラリーは、標的部位を切断し得る潜在的な触媒抗体の供給源である。特定のペプチドを切断部位に挿入することにより、この選択方法に特異性が与えられる。

この選択方法の1つの実施態様を実施例6に示す。繊維状ファージクローニングベクターM13K07(M13ベースのファージ;vieiraら)の遺伝子III(gene III)は、pIIIと呼ばれる主要ではないコートタンパク質をコードする(図16)。4〜5コピーのpIIIが各ファージ粒子のコートに挿入される(Smith1988)。pIIIはE. coliのF線毛タンパク質への結合を媒介し、この役割においては、感染を成功させるためには不可欠のものである(Nelsonら)。pIIIタンパク質は、ファージ粒子が集められる周辺腔への輸出のために前駆体の形態で産生される。有用なpIIIタンパク質の産生のためには、このタンパク質を周辺腔に導く輸出配列が、配列特異的ペプチダーゼによって切断されなければならない。

図14はM13ファージの感染サイクルを示す。成熟ビリオンは、主要なビリオンタンパク質pVIII、★の表示があまり十分ではない一方で、M13の主要でないビリオンタンパク質の化学量論および位置をはっきり示し、そして周辺腔に突出するように示されている。

本スクリーニングで用いるために、遺伝子IIIは、シグナルペプチダーゼ切断部位(図15)を破壊して、ペプチドコーディング配列の挿入のために好都合なクローニング部位を導入するように改変される。この改変ファージベクターはペプチドベクターと呼ばれる(実施例6)。いかなるもの潜在的な標的ペプチドをもコードする配列がこの部位に挿入され得る。

ペプチドベクターは、ファージミド組み合わせ発現ライブ

する候補ファージの初期の同定の後、触媒抗体の特異性が試験される。

プラスミドは、触媒抗体の精製を促すLAMBDA ZAPIIベクターから生成される(実施例6A)。単離された触媒抗体の特異性は以下のように試験される。まず、ヒトIgE分子をそれぞれの単離された触媒抗体によって切断する。切断産物のアリコートにSDS-PAGEによって分離し、次にニトロセルロース膜に移し、アルカリホスファターゼ結合ウサギ抗ヒトIgE抗体によりプローブする。もしくは、IgEは標準的な方法により放射性標識またはビオチン標識され得る。目的とする標的領域で触媒抗体によってヒトIgE分子を特異的に切断することにより、非還元条件下のSDS-PAGE上に2つのバンドが得られる。

候補触媒抗体が推定された切断フラグメントを生成すると

き、この切断フラグメントはHPLCまたは他のクロマトグラフィー分離方法によって単離され、抗体の切断部位を特異的に定義するためにN末端配列決定される。触媒抗体の配列認識特異性は、標的ペプチド配列の多くの変形を標的領域にわたるアミノ置換により生成することによって、さらに調査される。これらの標的は次に、基質として機能する能力が試験される。各抗体に対して特異的な切断配列または配列セットがこのデータから生成される。

上記の選択またはスクリーニング方法のいずれかによって得られる触媒抗体が標的基質に対して十分に高い親和性を有しない場合は、基質親和性は、H鎖をL鎖ライブラリー全体と、反対にL鎖をH鎖ライブラリー全体とと交換することによって増大し得る。このようにして生成されたライブラリーは上記の方法のいずれかによってスクリーニングされ、より高度な親和性を有する新しい抗体が得られる。親和性を増大させる第2の方法は、抗体の相補性決定領域の飽和突然変異誘発を行い、変異体をより高い親和性についてスクリーニングすることである。

また、IgE分子のみを切断し他のタンパク質は切断しない触媒抗体の特異性、すなわち選択性が試験される。選択性を検査するためには、本発明の触媒抗体が、これらが他の血清または細胞タンパク質に対して活性を有するかどうかを調べるために、異種タンパク質試料を消化するのに用いられ得る。例えば、血清タンパク質またはマスト細胞溶解物がIgE切断触

媒抗体で処理される。次にこれらの触媒抗体処理により得られる産物が、対応する未処理の試料の成分と同様に、二次元のタンパク質ゲル (Ausubelら) 上で分解される。処理されたおよび未処理の試料が、触媒抗体の存在から生じるタンパク質切断を同定するために比較される。ポジティブコントロールとして、試料は、触媒抗体での処理前にIgEでドープ (dope) され得る。この試験の感受性は、試料タンパク質の放射性標識 (例えば、ヨウ素処理または代謝標識)、またはウェスタンブロットティング法 (Ausubelら) の使用によって高められ得る。

11. アレルギー治療方法

IgEは、Fcドメインによって区別される9つのクラスの免疫グロブリンのうちの1つであり、1クラス内のすべての分子は同一のFc領域を有する。アレルギー応答は、個体が所定の抗原に反応して抗原特異的IgE抗体を産生するとき始まる (ステップ1、図14)。IgE分子は、所定の組織に固着するマスト細胞、および血液中を循環する好塩基性顆粒細胞の表面でIgE/Fc特異的レセプター、すなわちIgE抗体のFc領域に特異的なレセプターに結合する (ステップ2、図14)。多価アレルゲンが細胞表面結合IgE分子に結合しこれらと架橋するとき (ステップ3、図14)、細胞は顆粒消失する (ステップ4、図14)。このプロセスの結果、ヒスタミンのような所定の媒介物 (mediator) が放出され、これは、標的器官にアレルギー

症状を、例えば喘息における気管支痙攣または局所的アレルギー反応における浮腫を引き起こす (ステップ5、図14)。

本発明は、ヒトIgE分子 (図3) における2つのペプチド領域の切断に特異的なタンパク質分解抗体を同定するための様々なスクリーニングおよび選択を提供する。これらの領域のいずれかを切断することにより、IgE分子の架橋に導く多価抗原の結合を行うIgE分子のFab領域が、マスト細胞および好塩基性顆粒細胞への結合を行うIgE分子のFc領域から分離される。従って、自らのレセプター細胞に結合するIgE分子を本発明のタンパク質分解抗体に露出することにより、IgE分子の切断、およびこの結果、アレルギー反応の阻害が得られる。

A. 全身性治療方法

され得る。エアゾールミ

ストの吸入により、すなわち、口または鼻から呼吸管へミストを吸引することにより、上鼻咽腔領域、気管支管支領域、および肺領域を含む呼吸管の様々な部位に治療薬含有エアゾール粒子が配置される。

また、治療薬が粒子の形態で、乾燥粉末としてまたは適切なキャリア溶媒システム内の微粉化された懸濁物として投与される吸入システムが当該分野で周知である。代表的には、触媒抗体は水溶液内に溶解され、フルオロカーボンタイプのプロベラント溶媒内に微粉化形態で懸濁される。エアゾール化の後には、プロベラント溶媒のほとんどは一瞬の蒸発によって失われ、呼吸管内で水分と置き換わり、この結果、水和化された微粉化粒子が配置される。

上述の両タイプの吸入システムは、触媒抗体を呼吸管内の部位に遊離状態で送達することに基づく。従って、タンパク質は迅速に利用される。微粉化粒子によりタンパク質の放出は緩やかになるが、呼吸管を刺激し得る。触媒抗体の呼吸管への放出を中期的および長期的の両方にわたって提供する1つの方法は、タンパク質をリボソームにより被包することである。治療薬をリボソーム包括形態で呼吸管に投与するリボソーム吸入システムについては既に記述されている (例えば、Radhakrishnanら)。リボソーム被包の利点の1つは、リボソーム懸濁液内に存在する非被包タンパク質は呼吸道内で直ちに利用可能であるということである：被包されたタンパク質は緩慢に放出されるため、一回の投与からより長期間の治療

が得られる。

本発明の触媒抗体はまた、鼻通路の治療のための単純な絞り出しボトル噴霧器 (squeeze-bottle atomizer) で使用するための溶液に溶解または懸濁され得る。同様に、上部呼吸管は標準的なポンプまたは加圧経日吸入器を用いて治療され得る。

C. 本発明の治療方法の利点

本発明の触媒抗体によるタンパク質分解攻撃から生じるIgEの分解産物は、IgE

本発明の触媒抗体を用いる全身性治療方法は、アレルギーのための予防治療として有用である。例えば、IgE切断触媒抗体の非経口投与は、血清中に存在するIgEのレベルを著しく減少させる。従って、IgEが存在しなければ、上述のアレルギー応答は起こらない。

本発明の触媒抗体は、滅菌生理食塩水、滅菌注射用5%デキストロース水、または殺菌5%デキストロース規定塩水のような適切な不活性担体での非経口投与用に調整される。投与量は薬学的に有効なものによって決定される。薬学的に有効な投与量は、IgEのレベルを著しく低下させるのに、および/またはIgEに結合するアレルゲンの生理的効果を緩和させるのに

有効な投与量として定義される。

B. 鼻または吸入治療方法

吸入は、鼻部血除去剤、ならびに喘息および他の気管支/肺の症状の治療に有用な薬剤を含む様々な治療用化合物を送達するための効果的な手段を提供する。鼻、気管支、および肺の症状を治療する吸入治療法の利点の1つは、薬剤が薬剤作用部位に直接送達されることである。別の利点は、非経口投与に比べて治療効果の始まりが迅速であることである。

Cross (1986) は、アレルギー性喘息は、ほとんどの場合、マスト細胞由来の媒介物が気道の微小環境に放出される結果であることを指摘した。さらに、マスト細胞媒介物の放出は、喘息の他の形態、例えば、運動で誘導される気管支痙攣にも同様に関与していると考えられる。従って、本発明の触媒抗体を用いる吸入療法は、このような気管支の悪い症状の進行を止める効果的な送達経路である。マスト細胞の表面のIgE分子の切断により、マスト細胞媒介物の放出が遮断される。

吸入により治療薬を送達するためのいくつかの方法が当該分野において周知である。1つの方法では、触媒抗体は、細粒ミストを形成するようにエアゾール化され得る適切な溶媒内に溶解される。このタンパク質含有溶液は、含気性 (pneumatic) または超音波噴霧器によって、または、もっと便宜的には、加圧されたフルオロカーボンプロベラントを含有する完結型噴霧器によって、エアゾール化

が通常自然に破壊されるため、有害であるとは考えられない。さらに、上述のように、IgEは全血清の中で僅かな部分のみを構成する：IgEの血清レベルは1ミリリットル当たり200ナノグラムの範囲であり、一方、IgGは1ミリリットル当たり12ミリアグラム、およびIgMは1ミリリットル当たり1ミリアグラムである。従って、循環しているIgEを中和するには、極めて低い投与量の触媒抗体を必要とするだけである。1:2の分子比で抗原に結合することによって機能する従来の抗体とは異なり、触媒抗体はその寿命内で多くの抗原分子を分解させ得、従って、酵素の場合に典型的である少量が必要なだけである。

第1の抗体ライブラリーはヒト脾臓から作成され得るが、他の種からの脾臓が連続してスクリーニングされ得る。ヒトの抗体のみが投与される場合は、これらは免疫系によって認識されない自己タンパク質であるため、免疫応答は取るに足らないものであるはずである。アロタイプ (遺伝子変異体)

またはイディオタイプ (特異的結合領域) に対するいくつかの応答が生じ得るが、投与された触媒抗体の濃度が低い場合、これらの応答の程度は低いはずである。高活性の抗体がヒト以外の種にのみ見いだされる場合には、これらの抗体の可変領域はヒトの定常領域およびフレームワーク領域に移植され得る (Morrisonら)。

以下の実施例は、標的ペプチドおよび標的ペプチドを含有する複合体を産生するための、およびペプチドを切断するのに有効な触媒抗体を選択するための様々な方法を例示する。これらの実施例は本発明を例示するためのものであって、本発明を限定するものではない。

実施例1

免疫グロブリン組合せライブラリーの生成

A. 組合せライブラリー

本質的にHuseらに記載されるように、まずFabフラグメントの組合せライブラリーを入ファージにおいて生成する。一般的アプローチを図1に大まかに示す。要するに、免疫グロブリンL鎖ならびにH鎖のVHおよびCH1ドメインに対するDNAコーディング配列を、以下のソースの1つから単離されたmRNAを基

質として用いたポリメラーゼ連鎖反応 (Mullis) によって増幅する：(i) 処理されていない (免疫化されていない) マウス脾臓細胞；(ii) ヒト末梢血液リンパ球；あるいは、(iii) 目的のIgE標的領域で免疫化された

マウスから得られるマウス脾臓細胞 (すなわち、ペプチド1またはペプチド2)。増幅プライマーに対する配列は、公知のL鎖、VHおよびCH1配列から選択する (Kabatら)。プライマーを標準的なオリゴヌクレオチド合成技術によって合成する。

LAMBDA ZAP IIベクター (Stratagene, LaJolla, CA) をHuseらが記載するようにに改変し、2つの非対称な制限部位 (例えばNotIおよびEcoRI部位)、リボソーム結合部位、および細菌pelB遺伝子から得られる分泌シグナル配列 (Betterら、Skerraら) を含む2つのベクターを生成する。次いで、増幅された生成物を改変LAMBDA ZAP IIベクター (Stratagene, LaJolla, CA) にクローニングすると、L鎖ライブラリーおよびH鎖ライブラリーが生成される (図1)。

次に、この2つのライブラリーをEcoRIで切断する。さらに、L鎖ライブラリーの左腕部およびH鎖ライブラリーの右腕部を、それぞれMluIおよびHindIIIを用いる切断によって小さいフラグメントに分割する。そして、L鎖含有フラグメントおよびH鎖含有フラグメントを組み換え (Maniatisら)、組合わせFab発現ライブラリーを生成する。Stratagene GIGAPACK GOLD Packaging Extract Kitを用いてLAMBDA ZAP IIクローンをパッケージする。パッケージした後、ファージを150mmプレート当たり30,000ファージの希望の濃度に希釈する。増地は、LB+0.2%マルトースあるいはNZYM+0.2%マルトース (Maniatisら) などのようにリッチである。プレートする細菌は、

E. coli XL-1 Blue株である。プレートする直前に、インプロピルチオガラクトシド (IPTG) を軟寒天細菌懸濁物 (Maniatisら) に添加する。

B. 培養された細胞からの発現抗体の検出

上記の組合わせライブラリーのさらに薄い希釈物、すなわち1プレート当たり500ブラークの希釈物をプレートし、ニトロセルロースに二重ブラークリフトを

Rockville MD) として示されるハイブリドーマによって産生される。第2のプラスミドは、ラット抗マウスIgG_{2b}モノクローナル抗体のH鎖のcDNAを含む。この抗体はラットIgG_{2b}イソタイプであり、7D2.1.4.5 (ATCC 寄託番号 HB 92) として示されるハイブリドーマによって産生される。これらのcDNAを部位特異的オリゴヌ

クレオチドに対する突然変異誘発の標準技術によって改変し、コドン210の領域内のIgG分子に挿入された縦列EcoRIおよびXbaI制限部位を含むようにする。このコドン210の領域は、ヒンジ領域の真上の抗体タンパク質分子の部分にほぼ相当する。次に、マウス抗ラットIgG_{2b}標的ペプチド (mIgG/e) およびラット抗マウスIgG_{2b}標的ペプチド (rIgG/e) 構築物を有するプラスミドを、対応するL鎖を発現するミエローマに形質転換する。得られた組換え抗体分泌ミエローマをブリストンで感染したマウスの腹腔腔にそれぞれ別々に挿入して腫瘍性腹水 (ascites tumors) を誘導し、ミリグラム量の2つの組換え抗体を生成する。

濁り層を形成するために、150mM NaCl、10mM HEPES、pH=7.4を含有する溶液中で2つの組換え抗体を別々に低融点アガロース (Bethesda Research Laboratories) と混合し、55℃に保つ。そして、一方のアガロース/抗体溶液を他方の溶液によって免疫複合体形成が観察されるまで (図5) 滴定するが、この免疫複合体の形成は混合された溶液が濁ることによって示される。

最終混合物を組合わせライブラリー (実施例1) の試験プレート (図6A) に塗布する。軟寒天は、試験プレート上に濁り層を形成して凝固する (図6B)。プレートを37℃でインキュベートする。標的ペプチド配列を切断する抗体によって組換え分子が3つに分裂するので、完全に格子を破壊し、その結果、別の濁り層の中で容易に見

ることができははっきりとしたブラークが形成される (図5Dおよび図6C)。触媒抗体の産生について試験がポジティブであるブラークは、上記のアクセシで精製され、再試験される。

実施例3

生成する。そして、フィルターを、上記の増幅されたL鎖およびH鎖 (例えば、抗マウスκ鎖) に対する抗体を用いて免疫スクリーニングする (Ausubelら)。その後、L鎖およびH鎖タンパク質を共に発現するファージの頻度についてブラークを評価する。

実施例2

タンパク質分解抗体のスクリーニング：混濁重層法 (Turbid Overlay Method)

本実施例では、Fcレセプター結合ドメインから抗原結合ドメインを分離する方法でIgEクラスの免疫グロブリンを切断する触媒抗体の存在について、組合わせFab発現ライブラリーをスクリーニングする。スクリーニングは、組合わせライブラリーから生成されたブラークをIgEの集塊を含有する寒天層に重ね、それによって層を濁らせることを包含する。

基質として用いられる標的ペプチドを、εH鎖ドメインCε2から得る (図3参照)。本実施例の基質配列は、εH鎖 (領域I、図3) のアミノ酸残基235-253に対応する：この領

域のアミノ酸配列を一文字のコードで表すと、ILOSSCDGGHFPPTIQLLである。pUC19 (Bethesda Research Laboratories) のポリリンカー領域にインフレームでクローニングするために、突出した付着端を有する相補的オリゴヌクレオチドとして、このペプチドをコードする核酸配列を合成する。一連のクローニング工程において、完全な標的領域のコーディング配列に対応する多数のオリゴヌクレオチドフラグメントの縦列アレイを生成する。この合成遺伝子を生成するクローニング戦略全体が、当該技術分野において公知である (Crea, Yoshioら、Eatonら)。最終生成物はXbaIおよびEcoRI制限酵素でpUC19から切り出したものであり、これらの制限酵素のための部位はpUC19内の多重クローニング部位の両側にある。

次に、標的ペプチドをコードする切り出されたフラグメントは、インフレームで対応する制限部位 (すなわち、XbaI/EcoRI) で2つの分離したプラスミドに挿入される。1つのプラスミドは、マウス抗ラットIgG_{2b}モノクローナル抗体のH鎖のcDNAを含む。この抗体はマウスIgG_{2b}イソタイプであり、RG7/11.1 (ATCC 寄託番号TIB 174; American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Dr.,

タンパク質分解抗体のスクリーニング：放出リポーター法

本実施例においては、Fcレセプター結合ドメインから抗原結合ドメインを分離する方法で、IgEクラスの免疫グロブリンを切断する触媒抗体の存在について、組合わせFab発現ライブラリー (実施例1) をスクリーニングする。スクリーニングは、触媒抗体によるIgE特異的配列の切断に関する検出可能なリポーターの放出に依存する。

マトリックス形成法A

組換えによって産生されたマウス抗ラットIgG_{2b}標的ペプチド (mIgG/e) および実施例2で産生されたラット抗マウスIgG_{2b}標的ペプチド (rIgG/e) は上記のように単離される。抗体の炭水化物基は、O' Shannessyらの方法によって炭水化物ビオチン化試薬Biotin Hydrazide (Pierce, Rockford IL) を用いて標識される。抗体マトリックスを形成するために、150mM NaCl、10mM HEPES、pH=7.4を含有する溶液中で2つの組換え抗体を別々に低融点アガロース (Bethesda Research Laboratories) と混合し、55℃に保つ。そして、一方のアガロース/抗体溶液を他方の溶液によって免疫複合体形成が観察されるま

で滴定するが、この免疫複合体形成は混合された溶液が濁ることによって示される (図5A) 図5Bおよび図5C)。

マトリックス形成法B

組換えによって産生されたマウス抗ラットIgG分子を単離する (実施例2)、この分子はIgG分子の対応する領域に挿入されたIgE標的領域No. 1 (図3) コーディング配列を含む (この分子は、以下IgG/eと称する)。得られたIgG/e分子を単離し、炭水化物基はO' Shannessyらの方法によって炭水化物ビオチン化試薬Biotin Hydrazide (Pierce, Rockford IL) を用いて標識される。低融点アガロース (Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg MD) を用いて軟寒天上層を調製する (Maniatisら)。軟寒天上層は、10mM HEPES、pH=7.5および150mM NaClを含有する。IgG/eを液体軟寒天上層に添加する。この混合物に、ウサギ抗マウスIgG[F(ab')₂] (Pierce) をおよそ4倍過剰に添加する (図7Aおよび図7B)。この混合物を、低温で穏やかに攪拌する。

二番目の軟寒天溶液（10mM HEPES、pH=7.5および150mM NaCl）を調製し、ヤギ抗ウサギIgG（Pierce）を含有させる。この混合物を、低温で穏やかに攪拌する。

約10分間の混合後、沈殿物が形成され始めるまでIgG/e含有溶液をヤギ抗ウサギIgG溶液によって滴定する（図7C）。

スクリーニング法

次に、方法Aあるいは方法Bによって産生された軟寒天溶液を、組合わせライブラリーがプレートされているプレート

上に重層する（図8B）。

軟寒天上層は凝固することができる。10mM HEPES、pH=7.5および150mM NaClで濡らせたGeneScreenフィルター（New England Nuclear）を軟寒天に重ねる（図8Aおよび図8C）。

プレートを37℃に配置し、湿潤インキュベータで一晩インキュベートする。

次に、フィルターを除去し、50mM、pH=7.0のリン酸緩衝液で短時間洗浄する。そして、触媒抗体による切断によって（図7Dおよび図5D）抗体マトリックスから放出されたビオチン／タンパク質複合体（Ausubelら、Hsuら）の存在について、フィルターをアッセイする（図8D）。

試験プレートの領域がポジティブであることが同定されると、この領域にあるブラークを除去し、より低濃度のプレートで再プレートする。そして、スクリーニングを繰り返し、ポジティブブラークの選択を確実にする。

実施例4

タンパク質分解抗体のスクリーニング：遊離アミン蛍光法

本実施例では、Fcレセプター結合ドメインから抗原結合ドメインを分離する方法でIgEクラスの免疫グロブリンを切断する触媒抗体の存在について、組合わせFab発現ライブラリー（実施例1）をスクリーニングする。

基質として用いられる標的ペプチドは、以下のアミノ酸配列を有する実施例2に記載された標的ペプチドと同一である：

、上記のスクリーニングによって再試験する。

実施例5

ペプチド配列特異的標的切断可能な触媒抗体の選択

A. 組合わせライブラリーの構築

親ペクターが温度条件欠陥cro遺伝子を保持するように遺伝子学的に改変された（発明の詳細な説明を参照のこと）点以外は本質的には実施例1と同様に、組合わせライブラリーを構築しプレートする。上記の点以外は、親ファージは野生型であり、すなわちそれは成長するためにsupEの存在を必要としない。突然変異体親ファージは、標準的な遺伝学的操作により（Arberら、Davisら、Hubacekら、Maniatisら、Millerら）、または部位に向けられたオリゴヌクレオチド突然変異

誘発（Ausubelら）により生成される。ライブラリーを、実施例1と同様に、FABフラグメントの発現についてテストする。

B. croタンパク質融合を生じるプラスミドの構築。

cro遺伝子産物（Robertsら、Ovchinnikovら）のコーディング配列を、標準的な手順により末端にHindIII（5'）およびXbaI（3'）アダプター（Maniatisら）を有するように改変する。この配列を、β-ガラクトシダーゼコーディング配列に対してインフレームでpUC19ベクター（Bethesda Research Laboratories）のポリリンカーに、クローニングする。このベクター、pUC/croを、E. coliに形質転換し、そして増幅されたプラスミド（Maniatisら）を精製する。

113アミノ酸コリシンE1免疫（colE1 imm）タンパク質をコードする核酸配列を単離し（Goldmanら、Okaら、Yamadaら、Sutcliffeら）、標準的な手順（Maniatisら）により、その5'および3'末端が各々末端EcoRIおよびXbaIアダプターを有するように改変する。さらに、3'アダプターは、2つのインフレーム翻訳停止コドンを含む。実施例2で生成した合成標的配列（ILQSSCDGGHPPTIQLL）を、XbaIおよびEcoRI制限酵素によりpUC19ベクターから切り出す。pUC/croベクターを、XbaIおよびXbaIにより二重に切断する。その後、標的配列およびcolE1 immコーディング配列をベクターに連結し、その結果、croタンパク質、標的領域、およびc

ILQSSCDGGHPPTIQLL。ペプチドを標準インビトロ技術（Applied Biosystems、Foster City CA）によって合成し、フィルターに共有結合あるいは非共有結合させる。

ペプチドを非共有結合させる場合、ペプチドはアセチル化されたアミノ末端によって合成する。10mMペプチドを含有するpH7.0の50mMのリン酸緩衝液に1時間浸漬することによって、GeneScreenフィルター（New England Nuclear）をアセチル化された標的ペプチドで被覆する。そして、フィルターを50mMリン酸緩衝液で短時間に洗浄する。

共有結合については、（上記のように）ペプチドを含有するリン酸緩衝液にフィルターを浸漬することによって、フリーのアミノ末端を有するペプチドをImmobilon AV membrane（Millipore）に共有結合させる。そして、フィルターをリン酸緩衝液中で完全に洗浄し、すべての非結合ペプチドを除去する。

共有結合したフィルターおよび非共有結合したフィルターを調製した後、これらのフィルターを1mM IPTG、1mMジソプロピルフルオロリン酸および1mM O-フェナントロレン（O-phenanthroline）を含有する溶液に浸漬する。

ペプチド被覆メンブレンフィルターを各々試験プレート上に重ね、25℃で8時間インキュベートする。フィルターが除去された後でもプレートの方向がわかるように、フィルターに墨でマークする。フィルターをプレートからはし、0.2Mリン酸ナトリウム、pH7.5を多量に用いて洗浄する。最後に、

フィルターを0.4Mホウ酸緩衝液、pH8.0で洗浄し、以下の試薬のいずれかを噴霧する。

- 1) 0.2%フルオレスカミンを含有するアセトン
- 2) オルソフタルデヒド（Orthophthaldehyde）試薬（625μlメタノールおよび3.6ml 0.4Mホウ酸緩衝液、pH 8.0中にOPA25mgを含む）
- 3) 0.1%のダンシルクロリドを含有するアセトン。

これらの試薬によって遊離アミノ基を検出するが、遊離アミノ基が検出されることによって標的ペプチドが切断されていることが示される。フィルター上の反応スポットに対応するブラークを単離し、再びプレートすることによって精製し

olE1 immタンパク質（pUC/cro/mem）間のインフレーム融合を引き起こす。cro/標的/immリードスルー領域の核酸配列を、ユニバーサルプライマー

および公知の配列プライマーを用いて標準的な手順（Sequenase™、U.S. Biochemical Corp., Cleveland OH）により確認する。

pUC/cro/memベクターを、温度感受性アンバーリプレッサー（Hussainら）含有λ培養株に形質転換する（Maniatisら）。形質転換株を選択し、アンピシリン耐性を基にクローニングする（Maniatisら）。クローニングされたamp^r培養株を、実施例5Aに記載の組合わせライブラリー用のλ培養株として用いるために接種する。細菌を、アンピシリン含有培地（Arberら、Maniatisら）に培養する。ライブラリーの培養効率を32℃でテストする。その後、ファージストックの適切な希釈物をプレートして、32℃でのブラーク形成ユニットについて1プレート当たり以下の終濃度を得る：10⁷、10⁸、10⁹。その後、これらのプレートを42℃でインキュベートする。

ブラークは、（i）真正の、または偽復帰の温度条件感受性cro遺伝子、または（ii）cro標的immタンパク質複合体から野生型croタンパク質を解離する能力のある触媒抗体の存在により生成される。これらの可能性を区別するために、ブラークを採取して正常な培養株、すなわちpUC/cro/memベクターを欠く培養株、および培養株+pUC/cro/mem（amp^r）にトランスフェクトする。pUC/cro/memベクターが存在しない場合にブラークを生成する能力のあるファージ、すなわち、両方のバクテリア株上でブラークを生成する能力のあるファージは、真正の、または偽復帰の温度条件感受性cro遺伝子のいずれかであると

して排除する。ブラークを生成する能力がpUC/cro/memベクターの存在に依存するファージを、さらなる分析にかける。

実施例6

ペプチド配列特異的標的切断可能な触媒抗体の選択方法II

A. ペプチドベクター

ペプチドベクターを、M13K07（Vieiraら）から得る。M13K07の有用な特徴は以

下のとおりである：(i) M13ファージ形態形成に必要な全遺伝子を保持する；(ii) ファージの複製起点と相互作用して一本鎖DNAの生成を開始する遺伝子産物を産生する、突然変異した遺伝子11を保持する；(iii) 切断されたファージの複製起点を保持する；(iv) プラスミドの複製起点を保持する；および(v) カナマイシン耐性遺伝子を保持する。

非効果的ファージ複製起点と無傷のプラスミド複製起点との組み合わせは、宿主細胞内でM13K07がファージとしてよりもプラスミド(RF、複製型、DNAのような)として増殖することを好む。したがって、上記組み合わせは、ホストを殺すことなく維持され得る。さらに、プラスミド複製起点を有していることは、ファージミドの効率的なファージ増殖とは独立してプラスミド複製起点が複製し得ることを意味する。カナマイシン耐性遺伝子のおかげで、M13K07は増幅され得、そのことが、ファージミドDNAの、ファージ粒子へのパッケージ化を増加させる。

本発明のペプチドベクターは以下のようにして生成する。

遺伝子111のシグナルペプチダーゼ切断部位のコードン-3および-1を以下のように改変する。すなわち、コードン-3をセリンからフェニルアラニンへ、-1をセリンからトリプトファン(図15)へ改変する。遺伝子111の配列は、公知である(VanHezenbeck)。これらのコードンの改変を、標準的な手順(Ausubelら)により実施する。これらの置換は各々独立して、シグナルペプチダーゼの認識を妨げる(von Heijne)。したがって、シグナルペプチドの切断をもとに戻すためには、2つの突然変異を復帰させることが必要である。

さらに、ユニークなSpeIおよびXhoI部位を、シグナルペプチダーゼ切断部位の位置+1と+2との間に挿入する(図16および図17)。SpeI/XhoI制限部位は、選択された標的ペプチドをコードするオリゴヌクレオチドの指向性クローニングを可能にする。成熟遺伝子111タンパク質産物のアミノ末端に外来の配列を追加することは、感染性粒子を生成する成熟遺伝子111の能力を妨害しない(Parmleyら、Scottら、Devlinら)。

B. 標的ペプチドの、ペプチドベクターへのクローニング

切断の標的となる標的ペプチドをタンパク質から選択する。ペプチドの長さは

組合せライブラリーファージミドベクターを、Stratageneから利用可能なLambda ZAPベクター中で生成する。これらのM13ベースのプラスミドは、fdの複製起点を保持し、ファージ様特性とプラスミド様特性の両方を兼ね備えているため(図18) ファージミドと呼ばれる。

免疫グロブリン遺伝子の組合せライブラリーを、本質的には実施例1に記載したように生成する。L鎖およびH鎖遺伝子を含有する単一フラグメントを、lacZプロモーターに隣接するファージミドベクター3'にクローニングし、それによりM13ベースのベクター中で組合せFab発現ライブラリーを生成する。組合せライブラリーの各ベクターからファージミドを切り出す(図18) (Shortら、Lambda ZAP II製造者の指示に従う)。

D. ファージミド組合せライブラリーのエレクトロポレーション

ファージミド組合せライブラリーを、ペプチドベクターを用いて形質転換されたE. coliにエレクトロポレーション(Maniatisら)によって導入する。エレクトロポレーションは、標準的形質転換手順よりも遥かに効率的であり、10⁸を越える独立したクローンのライブラリーを生成することを可能にする(Cwirlaら)。代表的には、エレクトロポレーション

は、約80mlの細胞および4 μgのDNAにより、12.5kV/cmの5ミリ秒のパルスを用いて実施される。その後、細胞を、カナマイシン(25 μg/ml)含有LBプロスにおいて37℃で一晩成長させる。

E. 感染性ファージの採取および増殖

ファージ粒子を標準的な手順(Maniatisら)により一晩インキュベーションしてから回収する。簡単にいうと、培地を12,000×gで5分間遠心分離する。2 M NaCl/20%ポリエチレングリコールの容量の1/4を添加して15分間氷上でインキュベートし、その後、12,000×g、4℃で5分間遠心分離することにより、ファージ粒子を沈殿させる。

回収されたファージ粒子のわずかな画分のみが感染性であり、大部分は所望の特異性を有する触媒抗体をコードするファージミドDNAを含有する。これらを、E. coli株MV 1184にM13K07(Vieiraら)を共に感染させることにより回収する。

約4～20アミノ酸であるべきである。

2つのオリゴヌクレオチドを合成する。第1のオリゴヌクレオチド、すなわち遺伝子111タンパク質とインフレームで連続したオープンリーディングフレームを供給するセンス鎖は、5'から3'の方向に配列番号1のヌクレオチドを含有し、ペプチドのコーディング配列がそれに続いている。第2のオリゴ

ヌクレオチド、すなわちアンチセンス鎖は、5'から3'の方向に配列番号2のヌクレオチドを含有し、ペプチドコーディング配列の逆相補鎖がそれに続いている。2つのオリゴを、各オリゴを1.0ピコモル含有する反応混合物中でアニールする。

二本鎖オリゴヌクレオチドの0.1ピコモルに相当する、この反応物の1/10を、SpelおよびXhoIで切断したペプチドベクターRFDNA 1ピコモルと結合する。ベクター10に対して挿入物1という割合は、ベクター当たりの単一挿入物のクローニングを促進する。また、挿入オリゴヌクレオチドは、ウシアルカリホスファターゼ(Maniasisら)を用いて脱リン酸化され得る。

E. coliの適切な株(例えばMV 1184またはMV 1190、Vieiraら)を結合混合物(Maniasisら)により形質転換する。カナマイシン耐性コロニーを選択する。これらのコロニーを、末端が3'2Pで標識された配列番号1または配列番号2に相当するオリゴヌクレオチドを用いてハイブリダイゼーション(Ausubelら)によりスクリーニングする。

二本鎖DNAの小規模プラスミド調製物(Sambrookら)を、ハイブリダイゼーションによるテストでポジティブを示す、カナマイシン耐性コロニーから作製する。その後、単離されたプラスミドDNAをペプチドクローニング部位全体にわたって配列決定し、(i) 標的ペプチドをコードするオリゴヌクレオチドの単一のコピーが挿入されたこと；および(ii) 標的ペプチドコーディング配列と遺伝子111コーディング配列とを通し

て、連続したオープンリーディングフレームが存在することを確認する。

C. ファージミド組合せライブラリーの生成

個々のブラークから、さらなる分析に十分な一本鎖ファージミドDNAが調製され得る。

実施例7

触媒抗体のクローニングおよび特異性テスト

A. LAMBDA ZAP IIベクターからの、プラスミドのクローニング。

上記実施例2から6に記載の方法の1つにより触媒抗体を同定する。対応するブラークは、上記のように精製され再テストされたブラークである。ポジティブな結果の確認に基づ

いて、上記のように(Shortら) LAMBDA ZAP IIクローンの触媒抗体含有領域を切り出し、発現プラスミドが生成される。

触媒抗体をコードする遺伝子を含有するプラスミドを、別々にE. coliに形質転換する。プラスミドを保持する細菌の単一クローンを一晩培養するために5 mlのLBプロス(Maniasisら)に接種する。一晩培養した培養物3 mlを500 mlのLBプロスに接種し、37℃で4時間成長させる(Huseら)。最終濃度が1 mMになるようにIPTGを添加することにより、触媒抗体の合成を誘導する。その後、培養物を25℃で10～12時間インキュベートする。培養物を採取し、遠心分離により細胞を除去する。分泌された触媒抗体を含有する残留培地を、Amiconフィルターを用いた限外濾過により濃縮する。その後、TSK-G4000カラムを用いて、濃縮物をサイズにより分画する。組合せライブラリーを生成するために用いられる(実施例1) H鎖のC_H1ドメインに対して特異的なヤギ抗体を用いたELISAアッセイ(Ausubelら)により、画分をスクリーニングすることにより、触媒抗体を含有する画分を同定する。

B. 特異性テスト

ヒトIgE分子を、標準的な手順(Ishizakaら)を用いて単離する。Dulbeccoのリン酸緩衝生理食塩水1 ml当たり10 μgという最終濃度になるようにIgEを添加する。その後、この溶液を500 μlずつのアリコートに分割する。精製された触媒抗体の連続希釈物を調製し、IgE含有アリコートに添加する。37℃で反応を行い、0分、10分、30分、60分および120分で100 μ

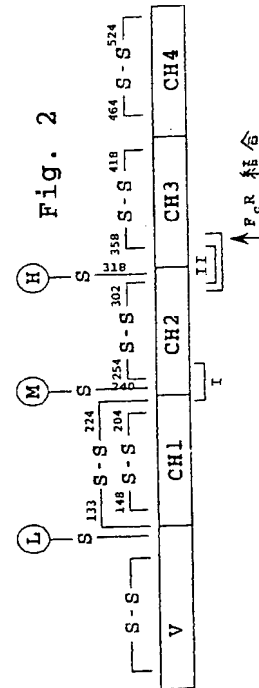
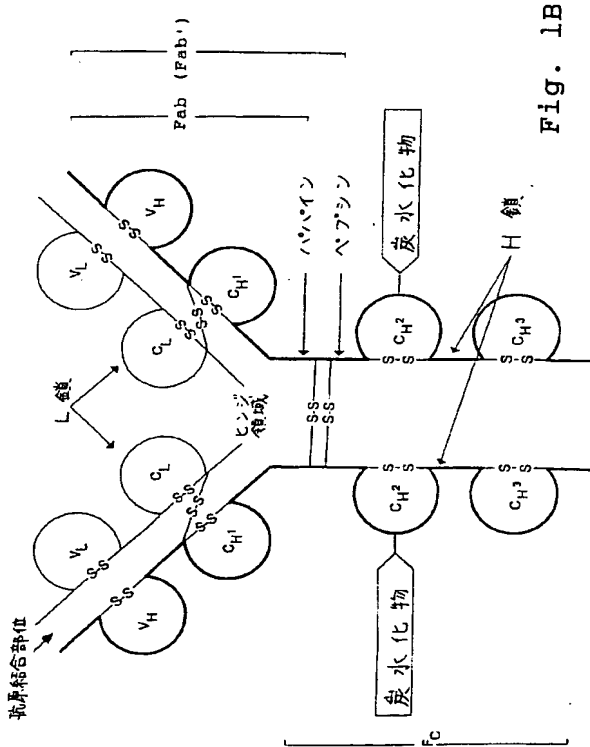
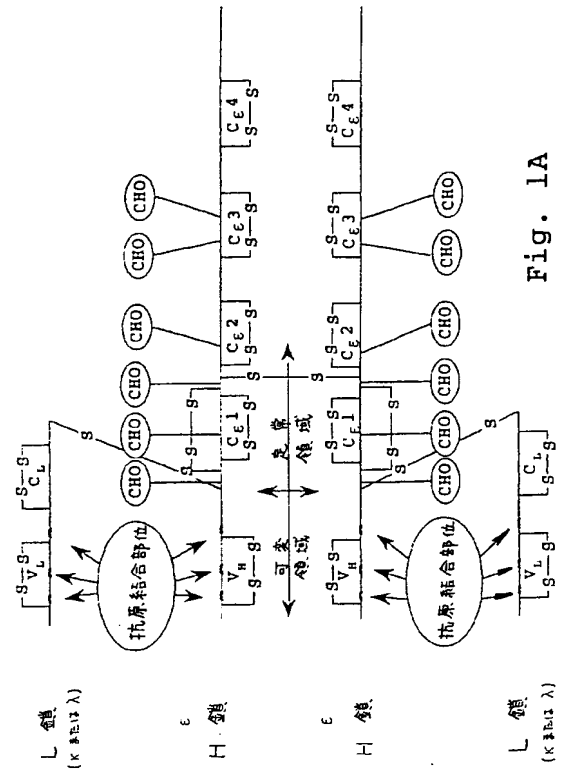
1)のサンプルを採取する。その後、アリコートにSDS-ポリアクリルアミドゲルにのせ、SDS-PAGEにより電気泳動的に分離する。次いで、タンパク質をニトロセルロースフィルター (Ausubelら)に移し、アルカリホスファターゼに結合したウサギ抗ヒトIgE抗体によりプローブする。

標的領域 I 中の触媒抗体によるヒト IgE 分子の特異的切断は、非還元条件下において IgE 分子の 3 つのフラグメント、すなわち、2 つの 50 キロダルトンフラグメントと 1 つの 150 キロダルトンフラグメントを生成する。

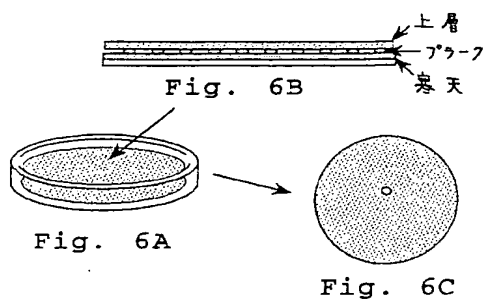
また、特異性は、標識された標的ペプチド自体の切断と上記の切断生成物の分析によってもテストされ得る。

切断部位を固定した後、標的領域全体にわたってアミノ酸置換を有する標的ペプチド配列の多くの変形例が、標的ペプチド配列の組換え操作により生成され得る。このようにして、切断に必要な配列が、より特定され得る。

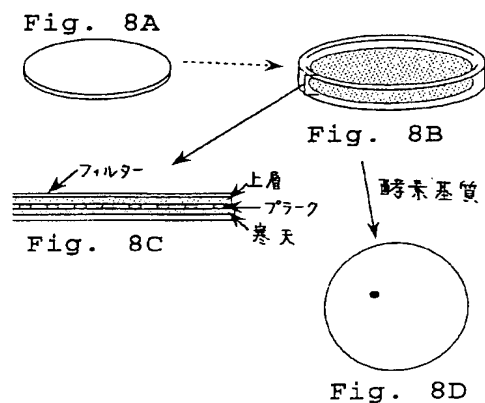
特異的IgE H鎖配列を切断し得る触媒抗体を生成および使用する特定の方法に
関して本発明を説明してきたが、本発明から逸脱しない限り様々な変更および改
変が可能であることは明らかである。特に、IgEペプチドを切断し得るF_{ab}フラグ
メントのクローニング選択の方法は、種々のペプチドまたはタンパク質に適用され得
ることが認識される。



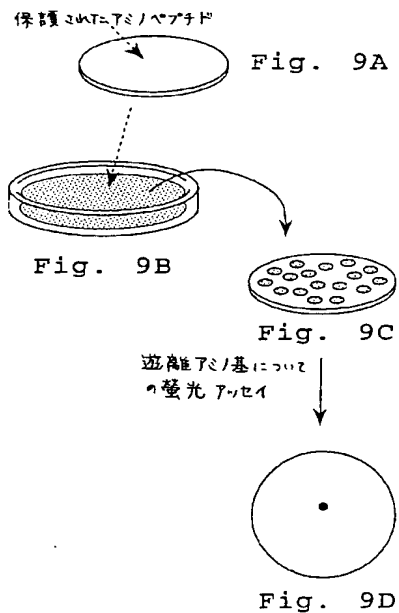
【図6】



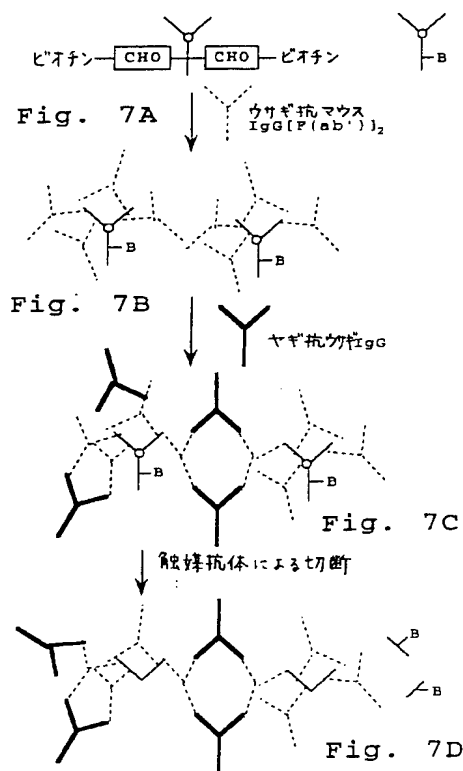
【図8】



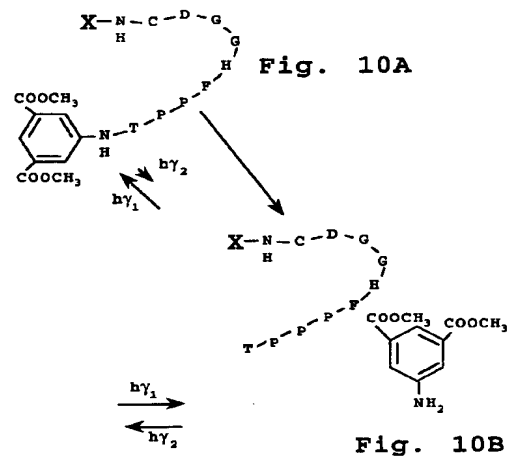
【図9】



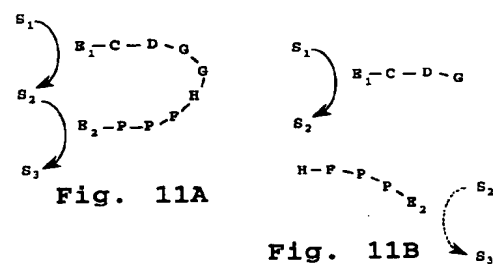
【図7】



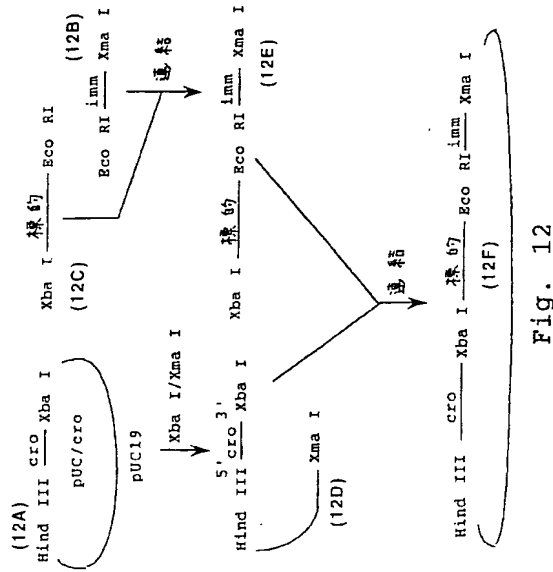
【図10】



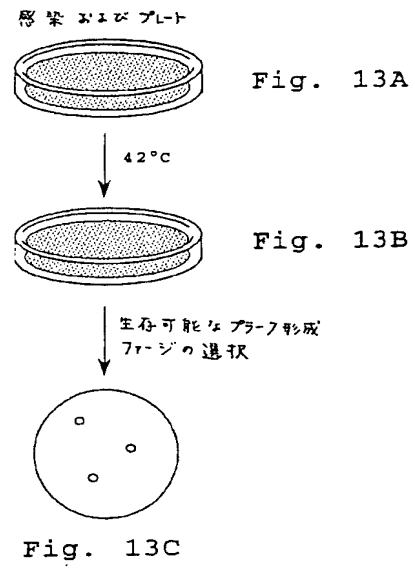
【図11】



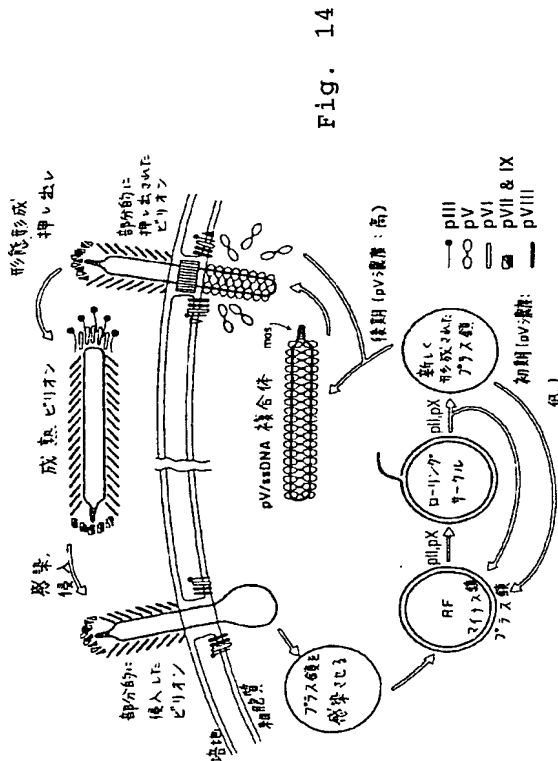
【図12】



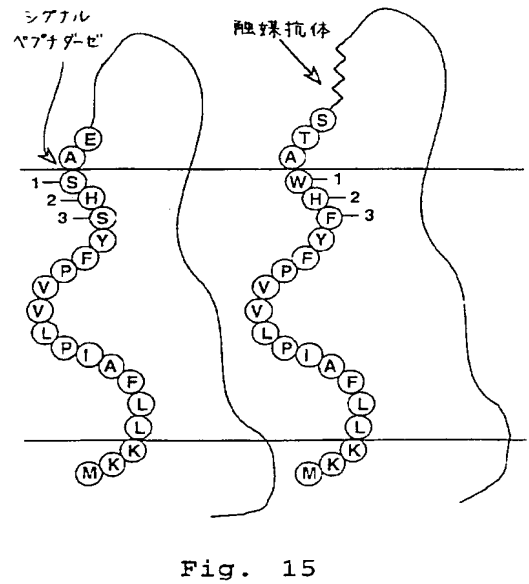
【図13】



【図14】



【図15】



【图 1-6】

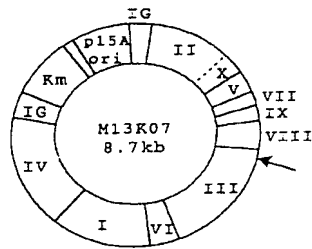


Fig. 16

【图 18】

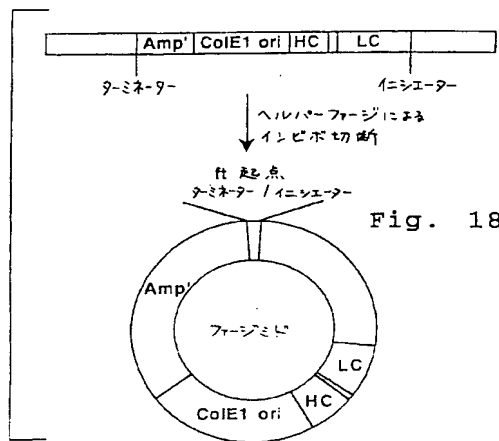


Fig. 18

【圖 1 7】

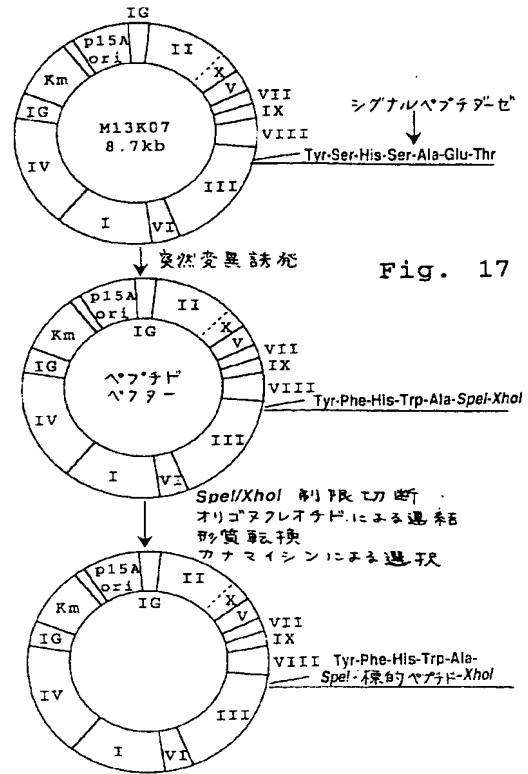


Fig. 17

【图 19】

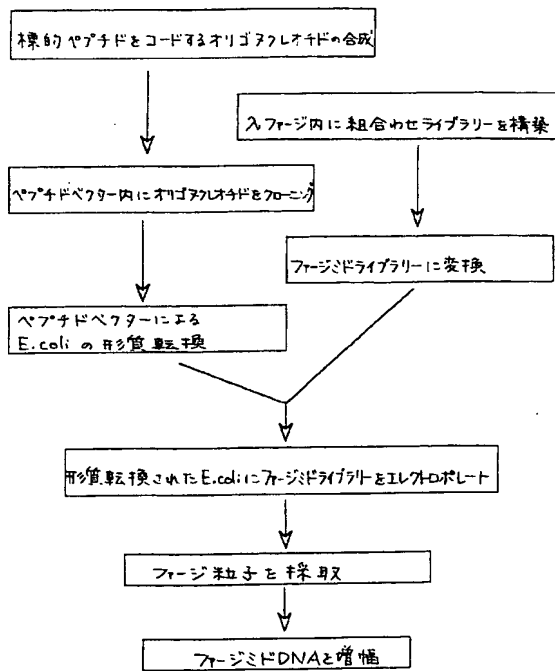
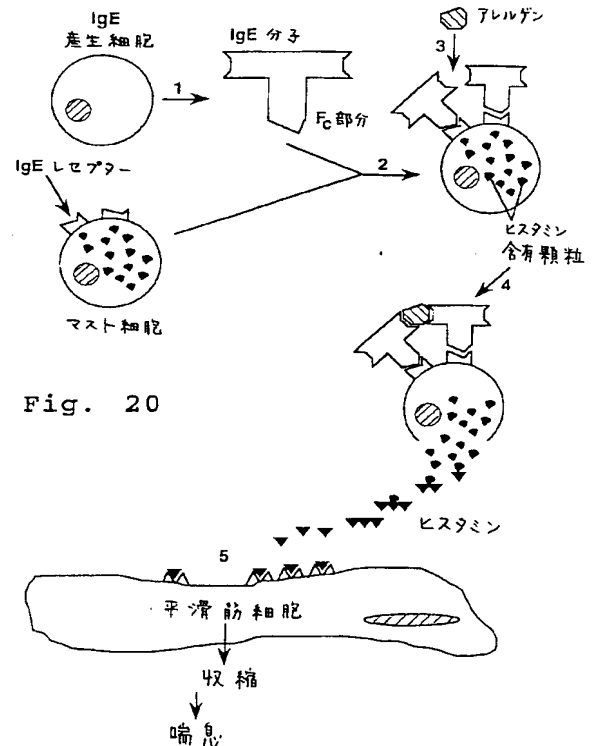


Fig. 19

【图 20】



フロントページの続き

- (72)発明者 デイビス、クロード ジェフリー
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94131,
サンフランシスコ、メルカト コート 10
- (72)発明者 ファビアン、ケイリー ロバート
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94061,
レッドウッド シティ、ルビー ストリー
ト 1163

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US93/03408

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(5) : C12N 15/09, 15/13, 15/33

US CL : 435/69.1, 69.7, 172.3, 252.3, 320.1

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

U.S. : 435/69.1, 69.7, 172.3, 252.3, 320.1; 530/350; 536/27

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

APS, STN/MEDLINE

search terms: catalytic antibody?, directed evolution, selection

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US, A, 5,096,815 (LADNER ET AL) 17 MARCH 1992, see entire document.	1-7
A	SCIENCE, Vol. 246, issued 08 December 1989, W.D. Huse et.al., "Generation of a Large Combinatorial Library of the Immunoglobulin Repertoire in Phage Lambda", pages 1275 to 1281, see entire document.	1-7

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

A document defining the general state of the art which is not considered to be part of particular relevance

E earlier document published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, each combination being obvious to a person skilled in the art.

Z

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

08 July 1993

Date of mailing of the international search report

14 JUL 1993

Name and mailing address of the ISA/US
Commissioner of Patents and Trademarks
Box PCT
Washington, D.C. 20231

Authorized officer

JOHN D. ULM

Facsimile No. NOT APPLICABLE

Telephone No. (703) 308-0196

Form PCT/ISA/210 (second sheet)(July 1992)*

【公報種別】特許法第17条第1項及び特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成12年8月15日(2000. 8. 15)

【公表番号】特表平8-511417

【公表日】平成8年12月3日(1996. 12. 3)

【年通号数】

【出願番号】特願平6-523068

【国際特許分類第7版】

C12N 15/09

【FI】

C12N 15/00 A

手続補正書

平成12年3月14日

特許庁長官 殿

1. 事件の表示

平成6年特許願第523068号

2. 補正をする者

住所 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94304, バロ アルト,

スイート 100, ハンセン ウェイ 3030

名称 カタリテック アンティボディーズ、インコーポレイテッド

住所 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94131, サンフランシスコ,

メルカト コート 10

氏名 デイビス、クロード ジェフリー

住所 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94061, レッドウッド シティ,

ルビー ストリート 1163

氏名 ジャビアン、ガイリー ロバート

3. 代理人

住所 〒540-6015 大阪府大阪市中央区城見一丁目2番27号

クリスタルタワー15階

氏名 (7828) 芥塚 山本 秀雄

電話(大阪) 06-6949-3910

4. 補正対象書類名

請求の範囲

5. 補正対象項目名

請求の範囲

6. 補正の内容

5. 請求の範囲を別紙のように補正する。

請求の範囲

1. 選択された標的ペプチドを切断し得る触媒抗体をコードする遺伝子を選択する方法であって、
(i) 適切な発現条件下で、クローニングベクターにおいて免疫グロブリン遺伝子を発現し得る該クローニングベクター内の再配置された免疫グロブリン遺伝子のライブラリー、および (ii) 感染性ファージの産生に必要な遺伝子産物をコードするファージ遺伝子を選択するファージベクターを、細菌細胞に導入する工程であって、該遺伝子は、該標的ペプチドのコーディング配列を、該遺伝子中に、得られる遺伝子産物が感染性ファージの産生を阻害するように導入することによって改変され、そして該標的ペプチドの切断により、感染性ファージの産生を可能とする活性遺伝子産物が得られる、工程、
該免疫グロブリン遺伝子が該細菌細胞内で発現する条件下で該細菌細胞を増殖させる工程、
感染性ファージの産生について該細菌細胞をスクリーニングする工程、および該感染性ファージと結合した該免疫グロブリン遺伝子を分離する工程を包含する方法。
2. 前記スクリーニングする工程が、ブラーク形成によって感染性ファージの存在を検出する工程を包含する、請求項1に記載の方法。
3. 前記ファージ遺伝子がファージコートタンパク質をコードする、請求項1に記載の方法。
4. 前記細菌細胞が、Escherichia coli細菌であり、前記ファージ遺伝子が遺伝子III産物の該細菌細胞の周辺腔への輸出を促すように該遺伝子IIIに導入される、請求項3に記載の方法。
5. (i) 前記ファージ遺伝子が、選択された増殖条件下でブラーク形成に必

要なファージタンパク質、第二のタンパク質、および第三のタンパク質に該ファージタンパク質を連結する能動的で構成される融合タンパク質をコードし、そして（１１）前記スクリーニングする工程が、前記選択された増殖条件下で増殖させるときブランクを発生し得るファージを検出する工程を包含する、請求項１に記載の方法。

6. 前記宿主細胞がEscherichia coli細胞であり、前記ファージがムファージであり、前記ファージタンパク質がcroタンパク質であり、そして該ファージが、選択された温度を超えると不活性であるゲノムcro遺伝子内に温度条件突然変異を含み、ならびに、前記スクリーニングする工程が該選択された温度を超えて実行される、請求項５に記載の方法。

7. 前記ファージタンパク質がλcroタンパク質であり、そして、前記第２のタンパク質がEscherichia coliコリシンR１免疫タンパク質である、請求項６に記載の方法。

8. 標的ペプチド配列を切断するのに有効な触媒抗体を発生する方法であって、（ｉ）適切な発現条件下で、クローニングベクターにおいて免疫グロブリン遺伝子を発現し得る該クローニングベクター内の再配置された免疫グロブリン遺伝子のライブラリー、および（１１）感染性ファージの産生に必要な遺伝子産物をコードするファージ遺伝子を有するファージベクター、を宿主細胞に導入する工程であって、該遺伝子は、該標的ペプチドのコーディング配列を、該遺伝子中に、得られる遺伝子産物が感染性ファージの産生を阻害するように導入することによって改変され、そして該標的ペプチドの切断により、感染性ファージの産生を可能とする活性遺伝子産物が得られる、工程。

該免疫グロブリン遺伝子が該宿主細胞内で発現する条件下で該宿主細胞を選殖させる工程、

感染性ファージの発生について該宿主細胞をスクリーニングする工程、

該感染性ファージと結合した該免疫グロブリン遺伝子を分離する工程、ならび

に

該分離された免疫グロブリン遺伝子を適切な発現系内で発現させる工程を包含する方法。